

**ISOLEMENT, IDENTIFICATION
ET QUELQUES SYNTHÈSES
DE COMPOSÉS DE LA MOUSSE DE CHÊNE
(EVERNIA PRUNASTRI (L.) ACH.)**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

GILLES NICOLLIER

Ingénieur chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

Août 1979
F. Stettler - DISS-PRINT - Fribourg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555009_0005

**ISOLEMENT, IDENTIFICATION
ET QUELQUES SYNTHÈSES
DE COMPOSÉS DE LA MOUSSE DE CHÊNE
(EVERNIA PRUNASTRI (L.) ACH.)**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

GILLES NICOLLIER

Ingénieur chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Isolement, identification et quelques synthèses
de composés de la mousse de chêne (*Evernia*
Prunastri (L.) Ach.)

de Monsieur Gilles Nicollier

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Tabacchi, A. Jacot-Guillarmod,
J. Garnero (Grasse) et S. Hüneck (Halle)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 12 novembre 1979

Le doyen :



K. Bernauer

K. Bernauer

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1.	<u>AVANT-PROPOS</u>	1
1.1.	Définition des lichens	1
1.2.	Morphologie des lichens	4
1.3.	Structure du thalle	8
1.4.	Organes portés par le thalle	8
1.5.	Métabolisme des lichens	9
1.6.	Utilisation des lichens	10
1.6.1.	Utilisation industrielle	10
1.6.2.	Usages médicaux	10
1.6.3.	Usages comme indicateurs écologiques ou de pollution	11
2.	<u>BIOCHIMIE ET BIOSYNTHESE DES LICHENS</u>	12
2.1.	Substances contenues dans les cellules	12
2.1.1.	Constituants du protoplasme	12
2.1.2.	Produits d'accumulation	12
2.2.	Substances contenues dans les hyphes	12
2.3.	Substances rejetées à l'extérieur des cellules	13
2.3.1.	Propriétés générales	13
2.3.2.	Substances de la série aliphatique	14
2.3.3.	Substances de la série alicyclique	15
2.3.4.	Substances de la série aromatique	15
2.4.	Les composés depsidiques	17
2.4.1.	Définition	17
2.4.2.	Série de l'orcinol	20

2.4.2.1.	Para-depsides	20
2.4.2.2.	Tridepsides	20
2.4.2.3.	Métadepsides	21
2.4.2.4.	Depsidones	21
2.4.3.	Série β -orcinol	21
2.4.3.1.	Para-depsides	22
2.4.3.2.	Métadepsides	22
2.5.	Biosynthèse des substances lichéniques	22
2.5.1.	Série aliphatique	22
2.5.2.	Série aromatique	24
2.5.3.	Série alicyclique	25
3.	<u>RECHERCHES ENTREPRISES</u>	28
3.1.	Introduction	29
3.2.	Extraction	29
3.2.1.	Concrètes industrielles	29
3.2.2.	Traitement de la concrète	30
3.2.3.	Mousses sèches de chêne	30
3.3.	Techniques et conditions de séparation	31
4.	<u>ISOLEMENT DE COMPOSES DE LA MOUSSE DE CHENE</u> <u>PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE</u>	34
4.1.	Composants phénoliques et polyphénoliques connus de la mousse de chêne	34
4.2.	Isolement et purification des produits contenus dans A	37
4.3.	Isolement de la fraction acide B	38
4.4.	Isolement de la fraction P	44
4.5.	Isolement de la fraction T	46

5.	<u>IDENTIFICATION DES COMPOSES ISOLES PAR</u> <u>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE-LIQUIDE</u>	50
5.1.	Identification de A ₁ : ac. Usnique	50
5.2.	Identification de A ₂ : Friedeline	53
5.3.	Identification de A ₃ : Moretenone	56
5.4.	Identification de A ₄ : Evernine	60
5.5.	Identification de A ₅ : Atranol	66
5.6.	Identification de A ₆ : ac. Lécánorique	67
5.7.	Identification de A ₇ : ac. O-méthyl-2' Evernique	71
5.8.	Identification de A ₈ : ac. Prunastrique	76
5.9.	Identification de P ₁ ['] : Méthyl-3' Lécánorate de méthyle	85
5.10.	Identification de P ₂ ['] : ac. O-diméthyl-4,2" Gyrophorique	89
5.11.	Identification de P ₃ ['] : ac. Méthyl-3' Evernique	94
5.12.	Stéréochimie des depsides	99
5.13.	Identification de T ₁ ['] : Ester de l'ac. Everninique	102
5.14.	Identification de T ₂ ['] : Ester de l'ac. Haematomique	107
5.15.	Identification de T ₃ ['] : Lanostérol	112
5.16.	Identification de T ₄ ['] : Lupéol	115
5.17.	Identification de T ₅ ['] : ac. Ursolique	118
5.18.	Identification de T ₆ ['] : Rimuène	121
6.	<u>IDENTIFICATION DES PRODUITS ISOLES PAR</u> <u>CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE</u>	122
6.1.	Introduction	122
6.2.	Analyse en CG/SM de P ₁	122
6.2.1.	Spectres de masse des composés nouvellement identifiés dans P ₁	125
6.2.2.	Spectres de masse des composés non tabulés dans la littérature	129
6.2.3.	Schéma de fragmentaiton de diméthyl-3,5 décène-4 one-3	131
6.3.	Analyse en CG/SM de T ₇	133
6.3.1.	Spectres de masse des composés nouvellement identifiés dans T ₇	135

6.3.2.	Spectres de masse de composés non tabulés dans la littérature	140
6.3.3.	Schéma de fragmentation des phényl-2,3,4,5 alcane	145
6.3.4.	Schéma de fragmentation des phényl-1,5 alcène-3	146
6.4.	Fraction neutre d'une concrète hexanique	147
6.4.1.	Introduction	147
6.4.2.	Spectres de masse des composés nouvellement identifiés dans la fraction hexanique	150
7.	<u>COMPARAISON ENTRE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MOUSSE SECHE DE YUGOSLAVIE ET LA CONCRETE INDUSTRIELLE, ET COMPARAISON TAXONOMIQUE ENTRE DES MOUSSES DE CHENE DE DIFFERENTES PROVENANCES</u>	152
7.1.	Comparaison entre témoins de concrète industrielle de chêne de Yougoslavie et extraits de mousse sèche pulvérisée.	152
7.2.	Comparaison taxonomique entre des mousses de chêne de différentes provenances	157
8.	<u>SYNTHESE DE DEPSIDES</u>	162
8.1.	Introduction	162
8.2.	Protection de groupes fonctionnels	163
8.3.	Synthèse d'intermédiaires	163
8.3.1.	Synthèse de l'orsellinate de méthyle	164
8.3.2.	Synthèse de l'hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoate de méthyle	166
8.3.3.	Synthèse de l'acide hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoïque	166
8.3.4.	Synthèse du dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de benzyle	167
8.3.5.	Synthèse du O-benzyl-4 hydroxy-2méthyl-6 benzoate de méthyle	167

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué de octobre 1975 à septembre 1979 dans les laboratoires de Chimie Organique Analytique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, sous la direction de Monsieur le Professeur Raffaele Tabacchi, à qui j'exprime toute ma reconnaissance, pour les conseils qu'il a su me donner, pour l'intérêt et le temps qu'il a consacré à mon travail.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur A. Jacot-Guillarmod pour l'intérêt porté à ce travail. Je tiens à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail:

- mes collègues assistants, en particulier Messieurs S. Claude, Luong Minh Duc, Jean-Bernard Weber, Michel Goetz, Roger Hofer et Edouard-Marc Meyer.
- Messieurs M. Rebetez, T.V. Vien et B. Domon qui, lors de leurs travaux de diplôme dans le cadre de cette thèse, m'ont bien aidé dans la synthèse de composés aromatiques.
- Les laborants, qui par leur travail quotidien, leur tâche quelquefois ingrate et leur dévouement, m'ont passablement aidé, tout particulièrement Mesdemoiselles C. Zbinden et A.-M. Stegmüller et Monsieur P.A. Rebetez.
- Monsieur Garnero et la Maison Robertet, pour l'initiative du sujet et la fourniture des matériaux de départ.
- L'Etat de Neuchâtel pour m'avoir confié un poste d'assistant qui m'a permis de réaliser cette thèse.

- Christine Boichard pour sa collaboration graphique.

INTRODUCTION

1. Avant-propos

La "mousse de chêne", nom donné par l'industrie de la parfumerie à un produit de départ constitué essentiellement du lichen "Evernia Prunastri (L.) Ach.", parasite du chêne, est connue depuis l'antiquité. Les Egyptiens s'en servaient déjà pour parfumer les objets les plus divers.

De nos jours encore, la "mousse de chêne" est très recherchée en parfumerie et l'extraction de ce lichen par des solvants volatils est pratiquée sur une grande échelle.

Depuis la fin du 19ème siècle, de nombreux travaux sur la composition chimique de ce lichen se sont succédés. [1 - 8]

Cependant, ce n'est qu'en 1937 avec Stoll et Scherrer [9] que débuta vraiment l'analyse des constituants volatils. Il faudra cependant attendre cette dernière décennie pour voir apparaître d'autres travaux sur le sujet: Corbier et Teisseire [10], Heide et al. [11] en 1974 et J. Gavin [12] dont nous avons continué l'étude entreprise.

1.1. Définition des lichens

Parmi les végétaux qui n'ont jamais de fleurs et qu'on appelle, pour cette raison, cryptogames, plusieurs espèces, telles que les mousses, les algues, les lichens et les champignons, se caractérisent par l'absence de vaisseaux dans leurs tissus

et par là-même, de nervures épaisses et ramifiées dans leur feuille, si elles en possèdent.

Les lichens diffèrent des mousses et des algues en ce que leurs tissus végétatifs ne sont pas uniformément remplis par la chlorophylle. Ils diffèrent également des champignons en ce qu'ils n'en sont pas complètement dépourvus. Pour la plupart des lichens, la chlorophylle est située dans la couche moyenne du tissu, entre deux autres couches blanchâtres dont les éléments (hyphes) sont semblables à ceux qui constituent exclusivement les champignons.

Ainsi, au microscope sur une coupe ou un écrasement, l'appareil végétatif des lichens se montre constitué par un entremêlement de filaments, la plupart incolores: les hyphes - analogues à celles du mycélium des champignons supérieurs - parmi lesquels apparaissent des cellules chlorophylliennes: les gonidies dont l'analogie avec des cyanophytes ou chlorophycées (algues) est très grande. [voir fig. 1.].

Tous les lichens sont donc formés par deux constituants - hyphes et gonidies - différents mais intimement associés; ceci nous permet de dire que les lichens sont des végétaux résultant de la symbiose d'un eumycète (champignons) avec un cyanophyte ou chlorophyte (algues). Les deux symbionts du lichen peuvent être séparés et cultivés dans des conditions spéciales et réunis à nouveau, l'hyphe du champignon enveloppant alors l'algue (voir fig. 2.) ou pénétrant les cellules de l'algue pour produire rapidement un échange de métabolites.

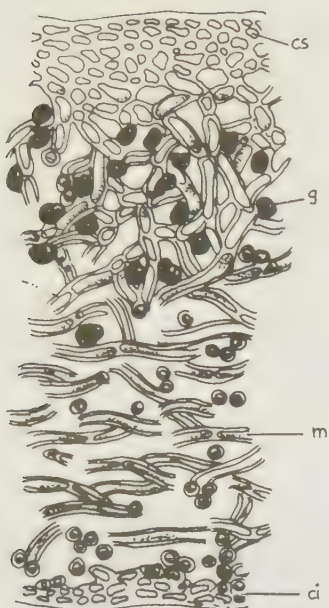


Fig. 1:

cs: cortex supérieur

ci: cortex inférieur

g : gonidie

m : médulle

≡ : hyphe

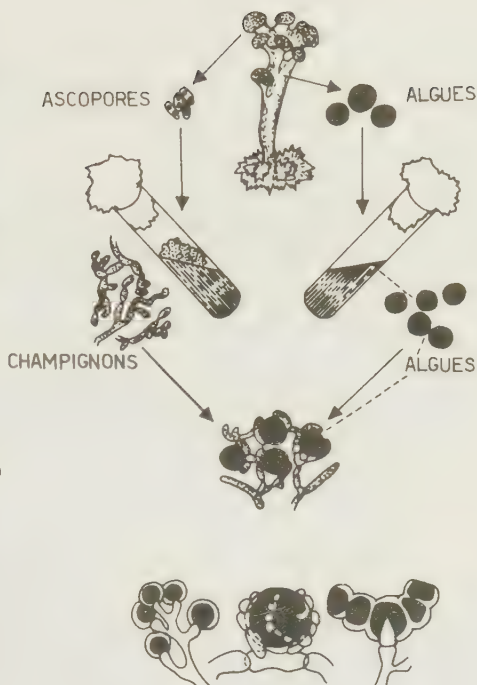


Fig. 2:

Biosynthèses des deux
symbionts

De cette association, chaque partenaire en tire son profit de trois façons que l'on peut résumer ainsi:

1. Les algues et les champignons nécessitent un milieu humide mais lors de leur association li-

chénisée, ils apparaissent fréquemment dans des endroits secs.

2. Les algues préfèrent beaucoup de lumière (photophytes) alors que les champignons choisissent l'ombre (sciophytes), mais sous forme lichénisée on les trouve indépendamment dans les deux situations.
3. Beaucoup de substances lichéniques ne voient le jour que dans l'organisme associé, en particulier certaines substances aromatiques (depsidiques) qui sont propres aux lichens.

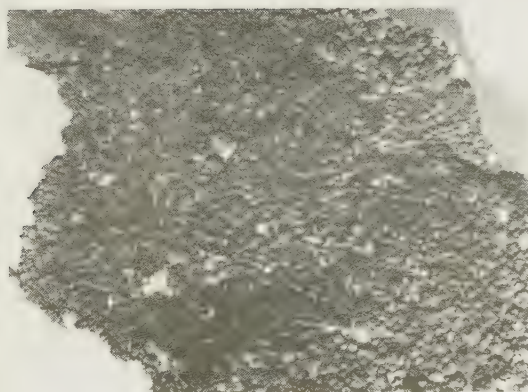
1.2. Morphologie des lichens

La morphologie externe et l'anatomie interne du thalle (appareil végétatif) des lichens sont extrêmement variables, depuis des formes rudimentaires jusqu'à des thalles bien différenciés; cette dissemblance provient en partie de la morphogenèse et de la prédominance du champignon chez certaines espèces.

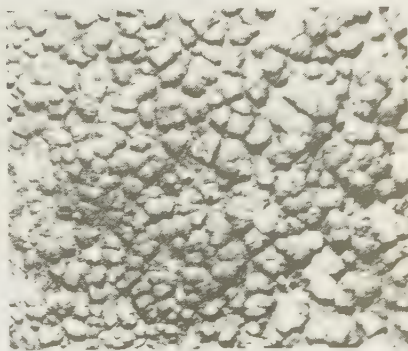
L'appareil végétatif ou thalle, chez les lichens est toujours plus développé que celui des champignons ou des algues. On classe les différents thalles des lichens en sept types morphologiques chacun pouvant comporter plusieurs catégories dont les trois principales sont:

- Thalles crustacés, fortement adhérents au substrat auquel ils sont parfois incorporés; ils représentent plus du 75% des lichens. (voir fig. 3.).

- Thalles foliacés, étalés sur le substrat, ils sont fixés à celui-ci par de petits crampons ou rhizines (voir fig. 4.).
- Thalles fruticuleux, non appliqués sur le substrat et n'adhérant à celui-ci que par une surface de fixation réduite, ils se répartissent en deux groupes: thalles en forme de tiges cylindriques plus ou moins ramifiées (*Usnea*) et thalles en forme de lanières ordinairement divisées (*Evernia*, *Ramalina*) (voir fig. 5 et 6.).



A



B

Fig. 3: Thalle crustacé
 Aspicilia épiglypta

A) vue d'ensemble

B) vue de détail

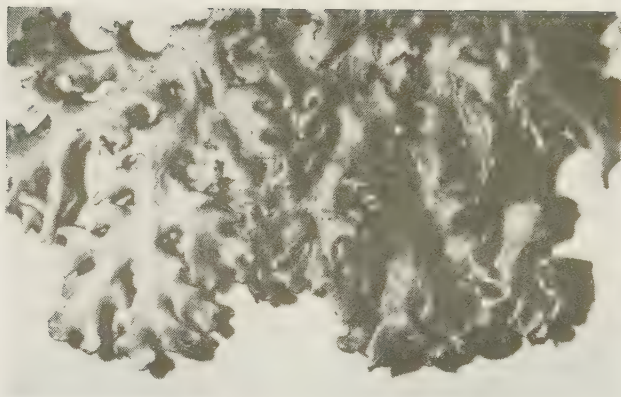


Fig. 4: Thalle foliacé de *Hypogymnia physodes*



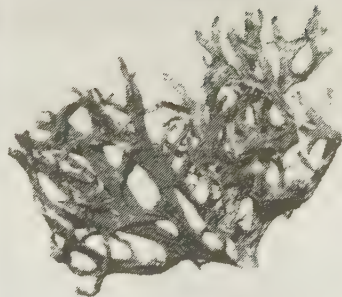
fig. 5:

Thalles fruticuleux d'*Usnea protea*, lichen pendant aux branches dans les montagnes humides. A la partie supérieure, fragments d'écorces adhérents à la tige du lichen élargie en une sole de fixation.



fig. 6:

Thalle fruticuleux.
(*Evernia prunastri*).



1.3. Structure du Thalle

La structure du thalle des lichens est moins différenciée que la morphologie. On distingue les structures homéomère, hétéromère, radiée, stratifiée et filamenteuse, toutes caractérisées par plusieurs couches bien visibles sur une section transversale et comprenant:

- le cortex, écorce superficielle à hyphes très serrées
- la couche gonidiale constituée par des hyphes plus lâches et contenant des cellules algales
- la médulle (moelle) à hyphes encore moins serrées
- le cortex inférieur pouvant former des rhizines ou points d'attache (voir fig. 1.).

1.4. Organes portés par le thalle des lichens

Le thalle des lichens porte en général outre les organes producteurs de spores, d'autres organes, ayant des fonctions très variées et permettant une différenciation superficielle:

- les rhizines, organes de fixation simples ou ramifiés, sont constitués par des faisceaux d'hyphes se terminant par une sorte de bouton adhésif.

- les fibrilles, produites par le thalle, en accroissent la surface et les échanges avec l'atmosphère
- les isidies et les sorédies sont des saillies à la surface du thalle, revêtues de cortex et dans lesquelles pénètrent des gonidies. Elles se détachent facilement du thalle, d'où leur rôle dans la multiplication végétative.
- les cyphelles et céphalodies sont des sortes de verrues cortiquées présentes à la surface du thalle.

1.5. Métabolisme des lichens

Le carbone pour les lichens provient en grande partie de l'activité photosynthétique de la partie algue. Par la suite, un certain nombre de composés (des sucres essentiellement) sont responsables de l'acheminement du carbone de l'algue au champignon. Par marquage ^{14}C et par séparation du thalle entre la couche inférieure de l'algue et le médulle (constitué uniquement d'hyphe du champignon) on a pu suivre cette migration.

Après 45 minutes d'incubation à la lumière, 60% du carbone fixé se retrouvait dans la partie champignon sous forme de mannitol. Ainsi, le rôle de l'algue participant à la symbiose s'avère prépondérant dans l'élaboration et le mouvement des hydrates de carbone.

En résumé, nous avons la photosynthèse au niveau de l'algue, suivie du transport du sucre au champignon, et biosynthèse des différents constituants (depsides, triterpènes, hydrocarbures, etc.) à partir des unités acétates et malonates elles-mêmes tirées des sucres.

L'apport en carbone provient également de la nourriture saprophytique dans l'environnement du lichen, c'est-à-dire de l'absorption de substances organiques à travers les rhizines du thalle.

L'azote nécessaire à la transformation chimique provient d'une part de l'absorption de composés azotés organiques et inorganiques et d'autre part de la fixation d'azote atmosphérique. Mais indubitablement, les lichens n'ont pas assez de composés azotés et c'est pour cette raison que leur croissance et l'élaboration de protéines sont très lentes.

1.6. Utilisation des lichens

1.6.1. Utilisation industrielle

Quelques espèces, principalement Evernia prunastri, furfuracea et pseudoevernia sont utilisées dans la fabrication de savon et essentiellement en parfumerie.

1.6.2. Usages médicaux

Le principal intérêt dans ce domaine réside dans l'extraction d'antibiotiques (Ex: l'acide usnique, pré-

sent en grande quantité dans la mousse de chêne de Yougoslavie), qui inhibent la croissance de bactéries, dont le staphylocoque doré et le bacille subtil.

1.6.3. Usages comme indicateurs écologiques ou de pollution

Beaucoup d'espèces de lichens ont une écologie très précise, de sorte que leur présence dans un milieu naturel est susceptible de donner des indications sur les caractères physiques et chimiques de ce milieu.

En effet, certaines espèces sont limitées à un hôte donné: roche calcaire ou silicieuse, terre humide, écorces acides ou encore stations riches en nitrate.

Les lichens sont encore de très bons indicateurs de pollution. La méthode consiste à dresser des cartes des espèces autour de zones étudiées, car la taille d'un lichen, sa présence ou simplement son absence, sont en relation avec le degré de pollution. L'appauvrissement en certaines espèces semble lié à la présence d'anhydride sulfureux se dégageant des industries. Par oxydation et entraînement dans l'eau de pluie, l'acide sulfurique formé modifie les substrats contribuant aussi à la disparition des lichens implantés.

Citons enfin que les lichens étant de bons accumulateurs de retombée radioactive, ils jouent là-aussi un rôle d'indicateur de pollution.

2. Biochimie et Biosynthèse des lichens

2.1. Substances contenues dans les cellules

2.1.1. Constituants du protoplasme

On trouve surtout des sels minéraux, des protéines, des acides nucléiques, des lipides complexes, des glucides et des enzymes.

2.1.2. Produits d'accumulation

Il s'agit surtout

- des pigments caroténoïdes en solution dans des gouttelettes d'huile
- des substances dites de réserve
- des lipides situés dans les hyphes, les gonidies et dans les spores sous forme de gouttelettes
- des glucides type glycogène et polyols.

2.2. Substances contenues dans les hyphes

- Substances minérales qui dépendent du milieu de fixation du lichen
- Glucides (lichénine, usnéine et hémicellulose) qui prennent une part importante dans la constitution des membranes des hyphes chez *Evernia prunastri*.
- Pigments et chitine.

2.3. Substances rejetées à l'extérieur des cellules

Elles sont toutes produites par les hyphes. A part quelques lipides, il s'agit des acides lichéniques, ou plus généralement, des substances lichéniques.

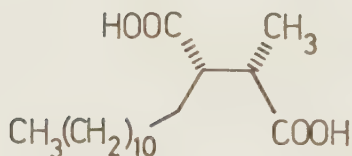
2.3.1. Propriétés générales

Les substances lichéniques ont été trouvées dans toutes les parties des lichens sauf dans le cortex inférieur et la couche gonidiale. Elles se présentent sous forme de minuscules cristaux ou granulations disposés à la surface des hyphes. Leur concentration varie entre 0,75 et 15% du poids sec du lichen. Leur répartition est en général étroitement liée à l'espèce et chacune d'elle contient une ou plusieurs substances déterminées en des proportions assez constantes. Tantôt il existe plusieurs acides caractéristiques à l'espèce, tantôt un acide unique comprenant des formes secondaires. L'existence de ces formes chimiques dépend des disponibilités enzymatiques. Ainsi, une espèce donnée pourrait posséder un depside qui se transformerait partiellement en depsidone chez les races où le champignon possède un système enzymatique déshydrogénant.

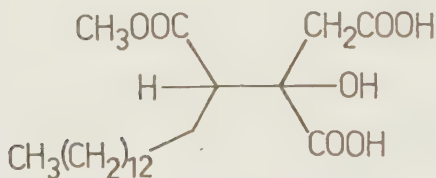
Ces substances lichéniques peuvent être réparties en trois catégories :

2.3.2. Substances de la série aliphatique

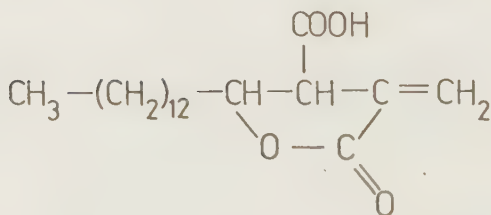
A) Diacides: Ex: acide roccelique



B) Triacides: Ex: acide capératique



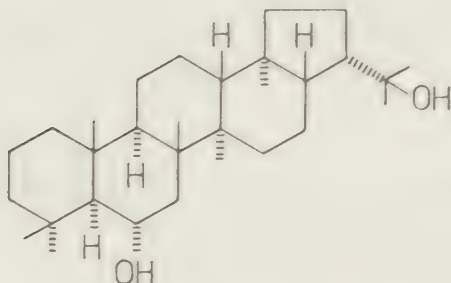
C) Acides-Lactones: Ex: acide protolichestérique



2.3.3. Substances de la série alicyclique

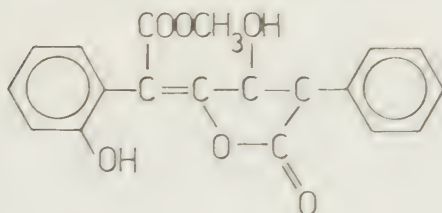
Diterpènes et triterpènes

Ex: Zeorine



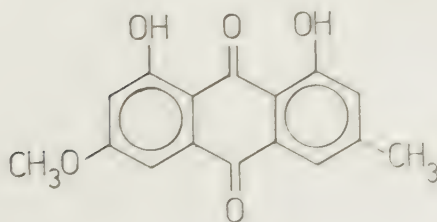
2.3.4. Substances de la série aromatique

- Dérivés de l'acide polylactique



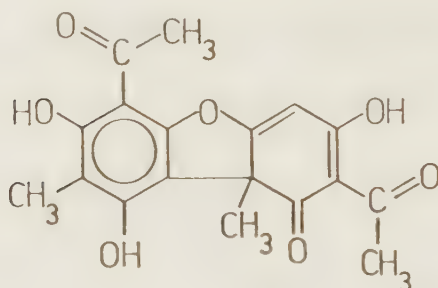
- Dérivés de l'anthraquinone

Ex: pariétine



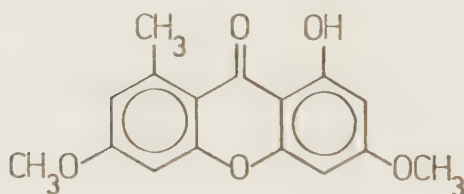
- Dérivés du dibenzofurane

Ex: acide usnique



- Xanthones, chromone

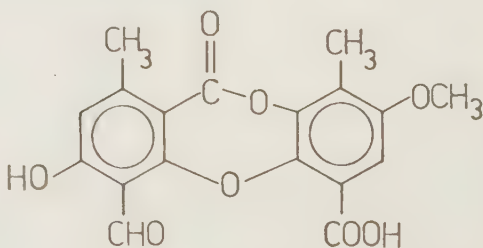
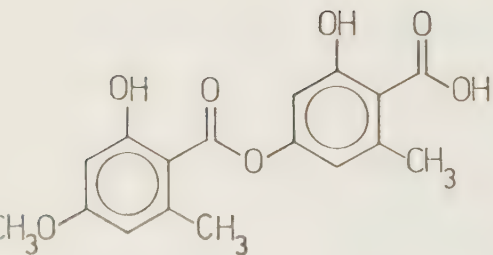
Ex: Lichexanthone



- Depsides et depsidones

Ex: acide évernique

Ex: acide psoromique



2.4. Les composés depsidiques¹⁾

Nous jugeons utile de revenir sur ses composés vu leur importance dans chaque espèce et principalement dans notre travail. Dans le paragraphe précédent, nous avons défini leur position dans le lichen, mais nous n'avons pas discuté de leur structure.

2.4.1. Définition

Dans cette classe de composés, sont inclus aussi bien les depsides (produits obtenus par estérification de deux, voir trois, unités phénoliques) et les depsidones formées, soit par oxydation conduisant à la liaison éther et estérification successive, soit par cyclisation oxydative du depside. Ces réactions chimiques ont lieu selon certaines hypothèse [13] grâce à des enzymes avec un substrat spécifique.

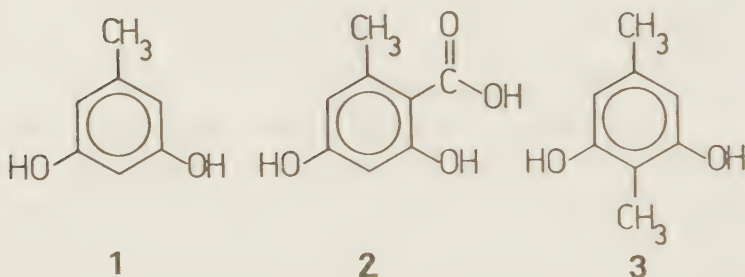
Ainsi, la depsidase qui catalyse l'estérification des unités S et A phénoliques montre une grande spécificité, surtout dans le cas où une chaîne hydrocarbonée se trouve sur une ou deux unités phénoliques.

Les unités phénoliques qui interviennent dans ces condensations, dérivant de la voie acétate-polymalonate, sont de deux types:

¹⁾ Une description détaillée de ces composés est donnée par Culbertson [14]

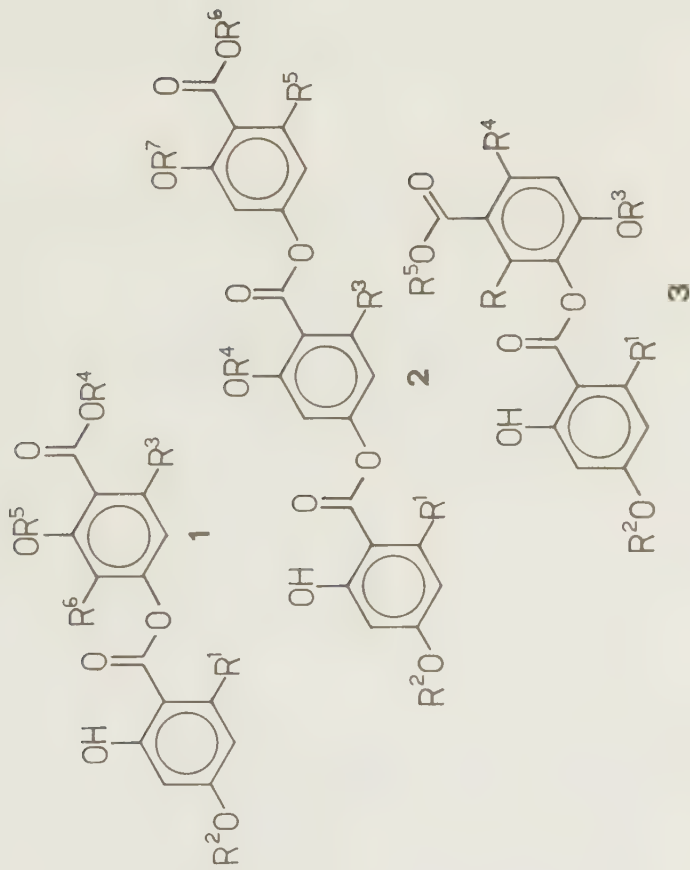
- a) orcinol (1), (représenté par l'acide orsellinique (2))
- b) β -orcinol (3) unité, possédant un substituant aliphatique en position 3.

Ex:



Dans le cas le plus simple, les depsides sont obtenus par estérification entre l'acide carboxylique d'une unité (S) avec un groupe hydroxyle en para d'une seconde unité (A). Cette réaction conduit aux para-depsides. (Exemple I, Schéma 1).

Une seconde estérification du même type donnera un tridepside (Exemple II). Si par contre l'acide carboxylique réagit avec l'hydroxyle en méta de l'acide, nous obtiendrons les méta-depsides. (Exemple III, Schéma 1).



SCHEMA 1.

R₁ R₂ R₃ R₄ R₅ R₆ = Me, H, chaîne aliphatique ou hydroxyle

2.4.2. Série de l'orcinol

2.4.2.1. Para-depsides

L'acide orsellinique est l'unité la plus primitive de la série si on la compare aux unités portant une chaîne aliphatique à 3, 5 ou 7 carbones, dont la biosynthèse requiert en plus des réductions et des déshydratations.

Il semble que les composés dérivés des unités C_3 , C_5 et C_7 sont plus communs dans les espèces évoluées. De plus, l'unité acide de l'orcinol est rarement combinée avec une unité possédant une chaîne aliphatique C_3 , C_5 et C_7 , exception faite pour la sphaerophine (depside) et la grayanique (depsidone). On remarque aussi que les composés formés avec une unité orcinol ne s'associent que très rarement avec ceux portant une chaîne aliphatique. Dans le cas d'*Evernia prunastri* (L.) Ach., nous n'avons qu'un composé avec chaîne aliphatique (l'acide divaricatique avec C_3 comme substituant), tous les autres étant constitués d'une unité C_1 , ce qui serait significatif d'une espèce plus primitive.

2.4.2.2. Tridepsides

Tous les tridepsides connus sont des dérivés simples de l'acide orsellinique. Le plus répandu dans les différentes espèces est, sans doute, l'acide gyrophorique.

2.4.2.3. Méta-depsides

Suivant la voie acétate-polymalonate, aucune unité ayant un hydroxyle en position meta par rapport à l'acide carboxylique n'est formée. L'estérification doit ainsi être précédée d'une hydroxylation. Si elle n'a pas lieu, on pourra avoir une attaque oxydative par le radical carboxylate d'une unité (S) sur une autre unité (A).

2.4.2.4. Depsidones

La cyclisation oxydative de depside en depsidone joint la position 2 du cycle A avec la 5' du cycle S. Le mécanisme de la réaction procède par un couplage intramoléculaire d'un radical phénoxy avec un radical aryle conduisant à la formation de la liaison éther de la depsidone.

2.4.3. Série β -orcinol

L'originalité des composés engendrés par cette unité réside dans la longueur de la chaîne et le degré d'oxydation des substituants en position 6 ou 3 (CH_3 , C_3H_7 , nC_5H_9 , nC_7H_{15} , CH_2OH , CHO , COOH). On ne connaît aucun tridepside formé à partir de cette unité.

2.4.3.1. Para-Depsides

Chez les para-depsides, le cycle (A) porte en position 3 et 6 un groupe méthyle.

L'oxydation du groupe méthyle en 6 dans le cycle (S) n'est généralement pas observé.

2.4.3.2. Méta-Depsides

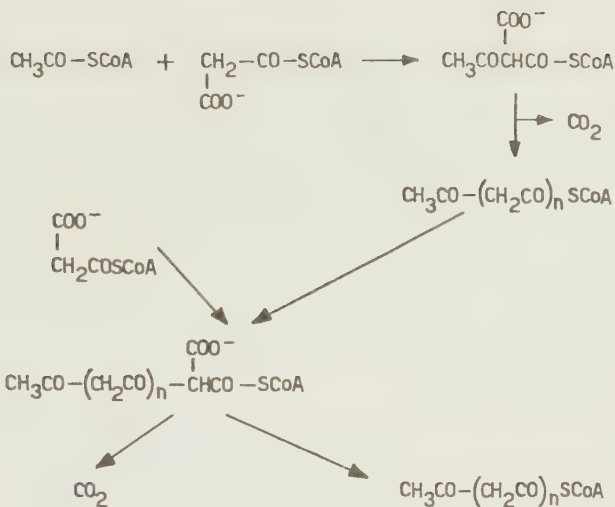
Trois méta-depsides de cette série sont connus, ils portent un méthyle en 4.

2.5. Biosynthèse des substances lichéniques [15]

Pour comprendre la biosynthèse des différentes substances typiques des lichens, nous adoptons le schéma de C. Culberson [16] , (voir schéma 3).

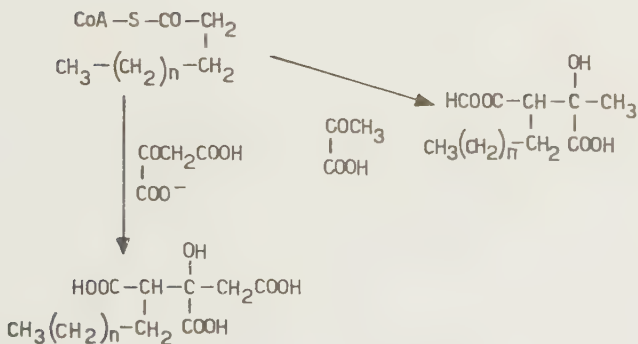
2.5.1. Série aliphatique

Les acides cétoniques sont obtenus directement par réaction entre une unité acétyl coenzyme A et une malonyl coenzyme A.



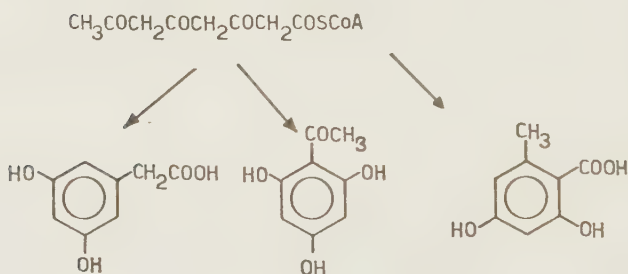
Les acides lichéniques aliphatiques proviennent de la condensation aldolique d'une chaîne plus ou moins longue d'un alcanolate SCoA avec un ou plusieurs acides cétoniques:

Ex:



2.5.2. Série aromatique

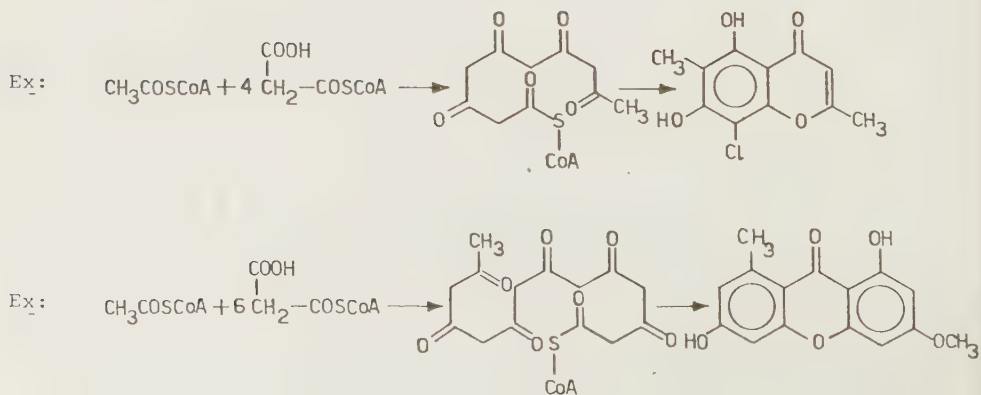
La condensation d'une unité acétyl-SCoA avec trois unités de malonyl SCoA conduit à l'acide trioxoocta-noïque 3, 5, 7. Par action enzymatique, il est transformé en ester soufré, lequel est cyclisé par condensation aldolique (a) ou condensation de claisen (C) pour donner les chromones, les xanthones et les anthraquinones.

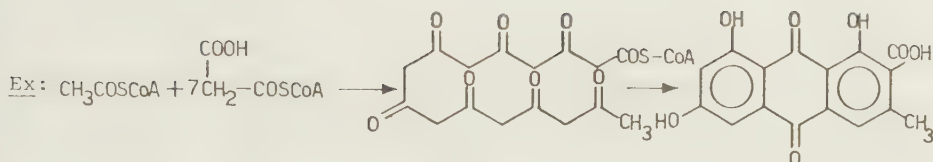


acide
dihydroxy 3,5
phénylacétique

acétyl-
phloroglucinol

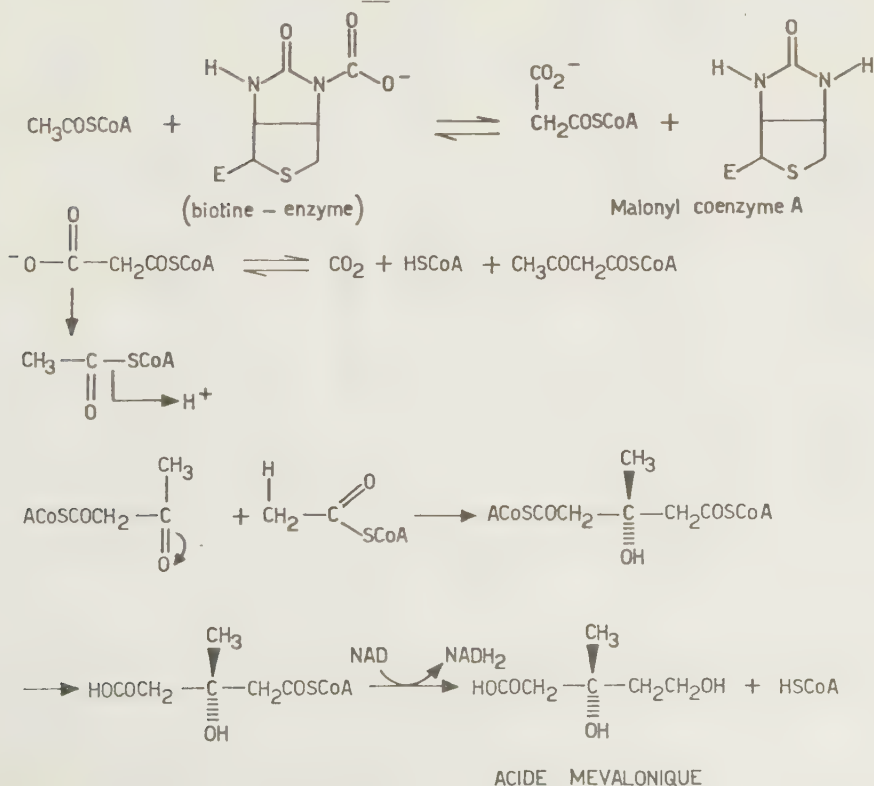
acide orsellinique





2.5.3. Série alicyclique

Les triterpènes, les stéroïdes et les caroténoïdes sont biosynthétisés à partir de l'acide mévalonique. (Voir schéma 2 [14] et P. Teisseire, La France et ses Parfums 65, 299-309 (1969)).



2.5. Biosynthèse des substances lichéniques (selon Culberson [16])

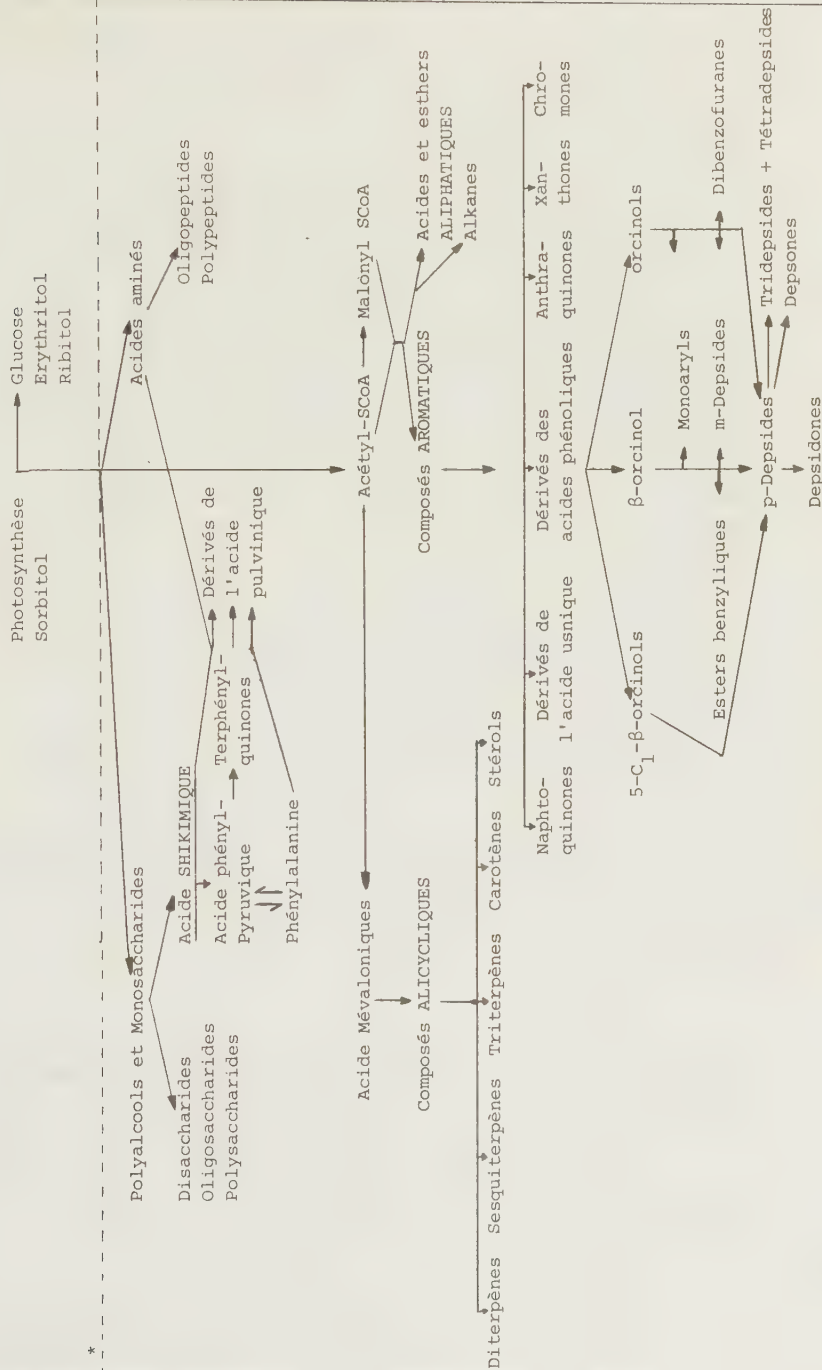


Schéma 3

* La ligne pointillée n'est pas fixe

3. Recherches entreprises

Notre travail est une contribution à l'étude de la composition chimique du Lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. Comme nous l'avons mentionné dans notre avant-propos, plusieurs travaux ont déjà été effectués sur le même sujet.

D'après certains auteurs [9-11] , et, l'analyse par chromatographie gazeuse, ce lichen contient de très nombreux constituants. Nous pensons cependant qu'avec les données de la littérature et cette étude, on devrait arriver à une bonne connaissance de la composition chimique d'*Evernia prunastri* (L.) Ach.

Dès le départ, notre travail s'orientera dans trois directions:

- l'analyse des fractions acides (depsides)
- la poursuite de l'étude des volatils commencée par Gavin [12]
- la synthèse d'un certain nombre de composés isolés.

Gavin et R. Tabacchi s'étaient surtout intéressés aux fractions neutres qui représentent quantitativement un faible pourcentage. Pour avoir une meilleure vue d'ensemble, nous étudierons en détail la fraction acide dont seulement les composés les plus abondants sont connus.

Notre travail consistera à extraire, séparer par plusieurs méthodes chromatographiques connues et identifier par spectroscopie IR, RMN ^1H et ^{13}C et SM des composés depsidiques, triterpéniques et aliphatiques des fractions neutres et acides. L'accent sera surtout porté sur l'étude des composés depsidiques, dont nous effectuerons aussi les synthèses.

3.1. Introduction

Comme matériel de départ, nous avons utilisé des extraits industriels sous forme de (concrète benzénique [17]) (produit Robertet et Cie) de mousse de chêne de Yougoslavie, ainsi que de la mousse sèche de différentes provenances (Yougoslavie, Maroc, France) que nous avons extrait par différents solvants. L'analyse de ces extraits nous permet de confirmer la présence des produits identifiés dans les concrètes industrielles, en particulier des depsides qui peuvent se dégrader facilement, soit pendant le stockage, soit pendant le processus industriel d'extraction.

Cette comparaison revêt aussi une importance taxonomique.

Pour la séparation, nous avons fait appel surtout à la chromatographie liquide sur colonne ouverte et liquide sous pression. Pour l'analyse des produits lourds, nous avons mis en oeuvre toutes les techniques spectroscopiques. En particulier, nous avons effectué pour la première fois les spectres RMN-¹³C de depsides.

Diverses analyses par CG/SM complèteront notre étude de la mousse de chêne.

Enfin, afin de confirmer certaines structures proposées, nous réaliserons plusieurs synthèses.

3.2. Extraction

3.2.1. Concrètes industrielles

Les essences concrètes sont obtenues par extraction de la matière végétale fraîche par des solvants tels que l'hexane, l'éther de pétrole, le benzène et quelquefois l'acétone, et évaporation du solvant (rende-

ment 2%-8%, en essence concrète).

De tels solvants sont utilisés parce qu'ils n'interviennent pas chimiquement au cours de l'extraction, contrairement à l'éthanol qui, dans le cas de la mousse de chêne par exemple, peut alcooliser les depsides et provoquer des transestérifications. Ainsi, dans notre travail, nous avons toujours utilisés les concrètes benzéniques.

3.2.2. Traitement de la concrète

La concrète benzénique est traitée 24 h à l'éther (50°C) pour précipiter l'acide usnique (présent en grande quantité), le dihydroxy-2,4 diméthyl-3,6 benzoate de méthyle (β -orcine carboxylate de méthyle) et l'acide évernique. Ces deux derniers n'étant présents qu'en faible pourcentage. Le filtrat est ensuite soit traité avec une solution de bicarbonate de sodium pour l'extraction des acides, soit concentré et filtré sur une colonne de terre de foulon (Kieselguhr) en éluant avec la ligroïne et l'acétate d'éthyle (voir schéma 4).

3.2.3. Mousses sèches de chêne

Afin de montrer l'influence éventuelle du milieu sur la composition chimique, nous utilisons trois mousses d'origine différente: Yougoslavie, Maroc et France (Vaucluse).

Cette comparaison nous permettra en même temps de contrôler la présence réelle dans la mousse de certains composants, des depsides principalement, que nous isolerons des extraits industriels.

Pour ce travail comparatif effectué par chromatographie sur couche mince et liquide sous pression (HPLC), nous avons extrait au soxhlet 100 g de mousse de chêne d'origine différente, préalablement triée, séchée et pulvérisée avec chaque fois 2 x 1 l de solvant pendant 24 h suivant le procédé décrit au schéma 5.

3.3. Techniques et conditions de séparation

Les techniques utilisées pour la séparation des constituants d'un extrait végétal sont:

- La chromatographie sur couche mince, sur colonne, liquide sous pression (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons surtout eu recours à la chromatographie d'adsorption, en utilisant comme support le gel de silice et l'alumine pour la séparation des composés depsidiques et triterpéniques, et la chromatographie d'exclusion sur gel de dextrane pour la purification des composés isolés.

Schéma d'Extraction de la concrète industrielle

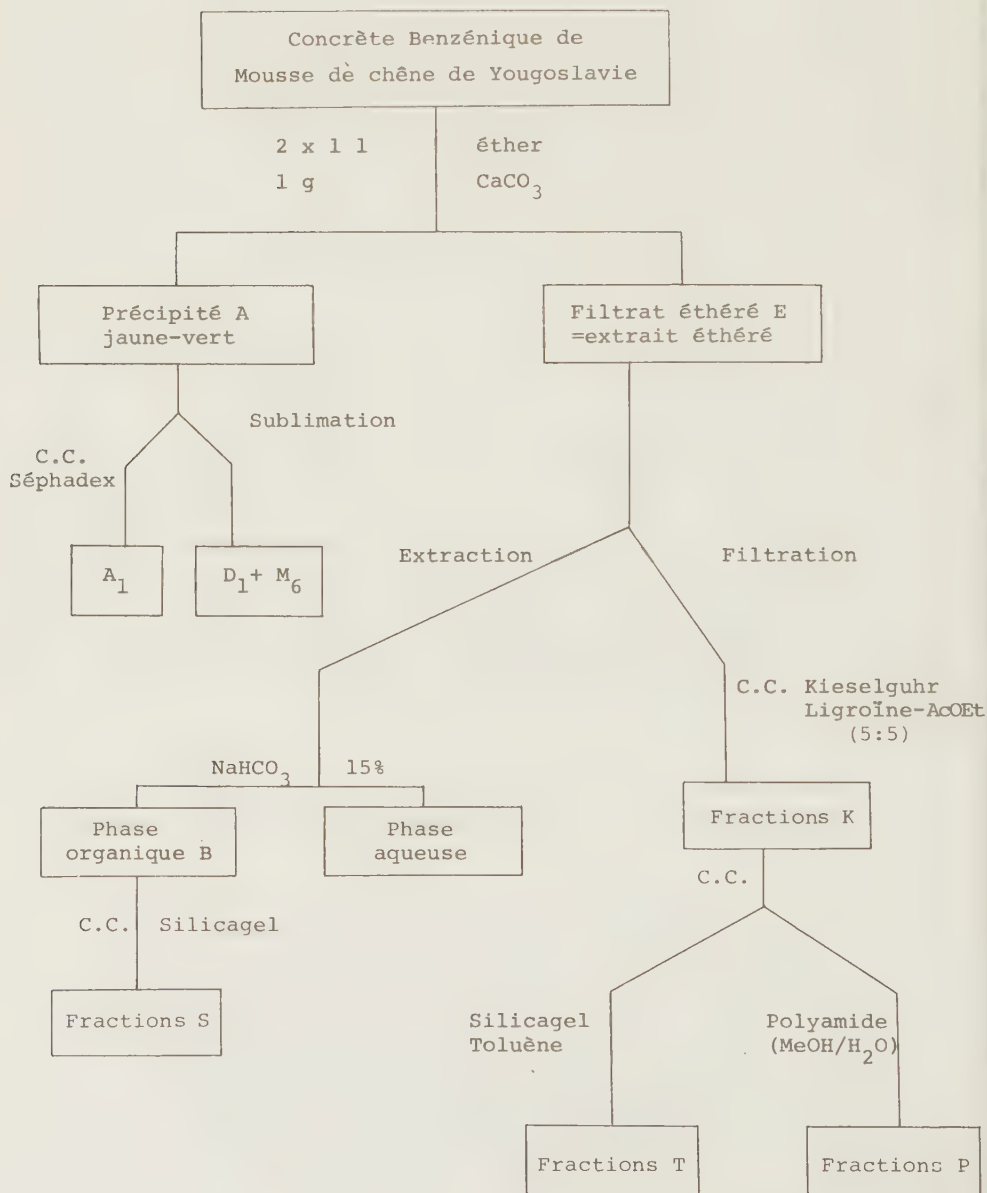
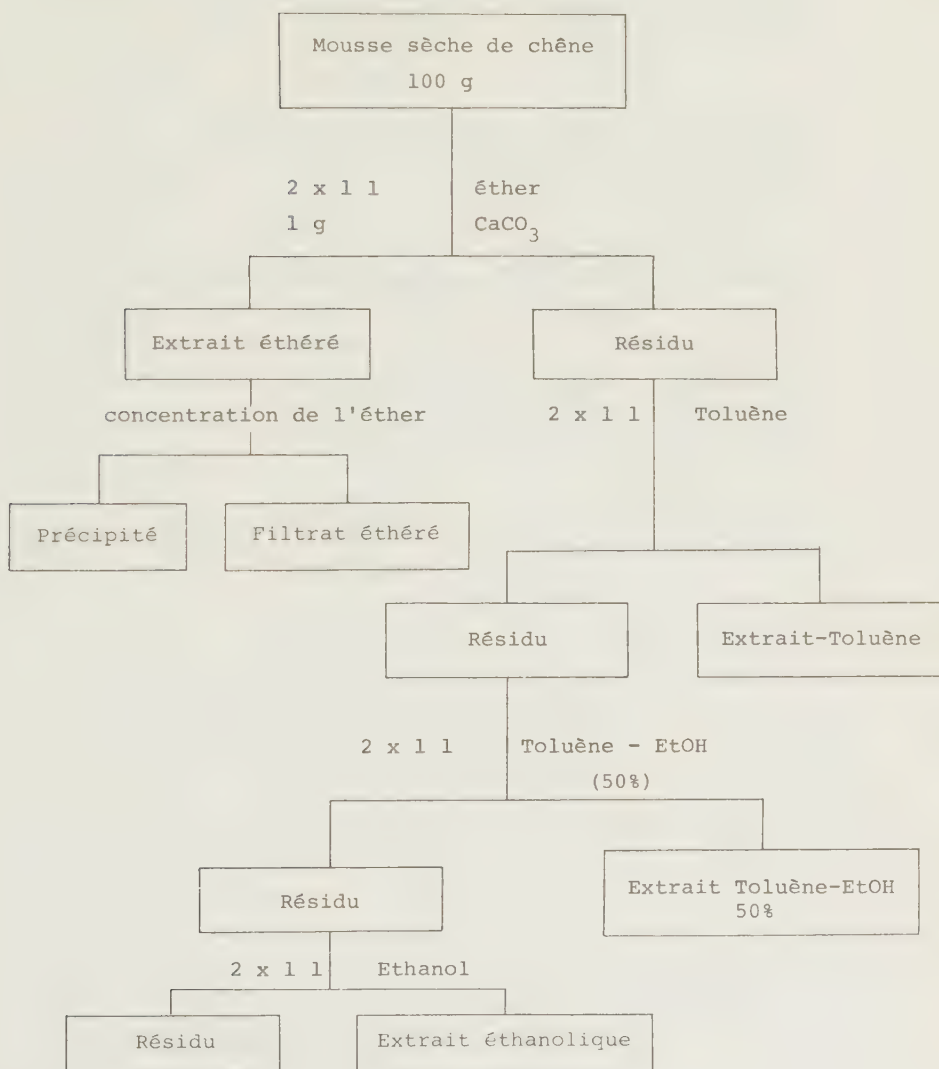


Schéma d'extraction des mousses sèches



4. Isolement de composés de la mousse de chêne par chromatographie sur colonne

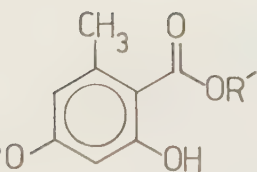
4.1. Composants phénoliques et polyphénoliques connus de la mousse de chêne

Au début de notre travail, un certain nombre de composés monoaryliques et de depsides avaient déjà été isolés et identifiés par différents auteurs dans des extraits de "mousse de chêne". Ces composés résumés dans le tableau ci-dessous seront utilisés comme témoins chromatographiques. Nous les désignons ainsi:

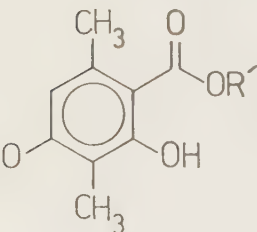
Monoarylés: M

Depsides: D

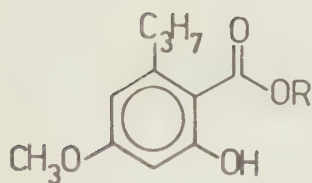
Monoarylés



- R=H, R'=CH₃ orsellinate de méthyle [4-6] M₁
 R=R'=H acide orsellinique [6] M₂
 R=R'=CH₃ sparassol [6] M₃
 R=CH₃, R'=H acide éverninique [4-6] M₄
 R=CH₃, R'=C₂H₅ éverninate d'éthyle [1-8] M₅



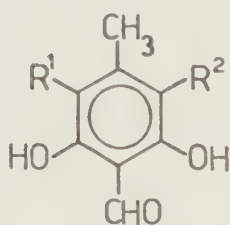
- R=H, R'=CH₃ β-orscine-carboxylate de méthyle [4-6] M₆
 R=CH₃, R'=CH₃ rhizoninate de méthyle M₇
 R=CH₃, R'=H acide rhizoninique [4-6] M₈



$R^1 = CH_3$ divaricate de méthyle [11] M_8

$R = C_2H_5$ divaricate d'éthyle [11]

$R = H$ acide divaricatique [11] M_9



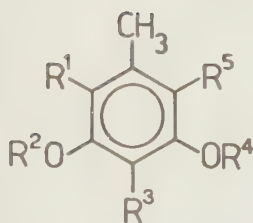
$R^1 = R^2 = H$ atranol [4-6] M_{10}

$R^1 = Cl$, $R^2 = H$ chloratranol [11] M_{11}

$R^1 = H$, $R^2 = COOH$ acide haematomique [11]

$R^1 = H$, $R^2 = COOMe$ haematomate de méthyle [11] M_{12}

$R^1 = H$, $R^2 = COOEt$ haematomate d'éthyle [11]



$R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = H$ orcinol [1-8] M_{13}

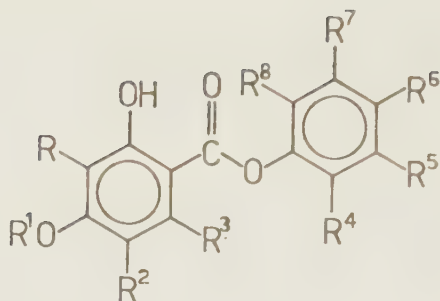
$R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = H$, $R^3 = CH_3$ β -orcinol [4-6] M_{14}

$R^1 = R^3 = R^4 = R^5 = H$, $R^2 = CH_3$ éther monométhyle de l'orcine [7]

$R^1 = R^4 = R^5 = H$, $R^2 = R^3 = CH_3$ éther monométhyle du β -orcinol [4-6]

$R^1 = Cl$, $R^2 = CH_3$, $R^3 = R^4 = R^5 = H$ éther monométhyle du chlorocinol [11]

$R^1 = R^3 = Cl$, $R^2 = CH_3$, $R^4 = R^5 = H$ éther monométhyle du dichlororocinol [11]



Depsides

D_1 : $R=R^2=R^4=R^8=H$ $R^1=R^3=R^5=CH_3$ $R^6=COOH$ $R^7=OH$
acide évernique [1-8]

D_2 : $R^1=R^2=R^4=H$ $R=CHO$ $R^3=R^5=R^8=CH_3$ $R^6=COOCH_3$ $R^7=OH$
atranorine [4 - 6]

D_3 : $R^1=R^4=H$ $R=CHO$ $R^2=Cl$ $R^3=R^5=R^8=CH_3$ $R^6=COOCH_3$ $R^7=OH$
chloratranorine [6]

D_4 : $R^2=R^4=H$ $R=R^1=R^3=R^5=R^8=CH_3$ $R^6=COOH$ $R^7=OH$
acide barbatique [4-6]

D_5 : $R=R^2=R^4=R^8=H$ $R^1=CH_3$ $R^3=R^5=C_3H_7$ $R^6=COOH$ $R^7=OH$
acide divaricatique [11]

D_6 : $R=R^5=COOH$ $R^2=H$ $R^1=R^3=R^4=CH_3$ $R^8=OH$ $R^7=CHO$
acide thamnolique [4]

Dibenzofurane: Acide usnique [18]

4.2. Isolement et purification des produits contenus dans A

Suivant le schéma 4, à partir de 350 g de concrète benzénique, nous obtenons 72,4 g de précipité (A) de couleur jaune-verte. Ce solide est filtré et lavé avec de l'éther chaud et analysé par chromatographie sur couche mince de silicagel (fig. 8).

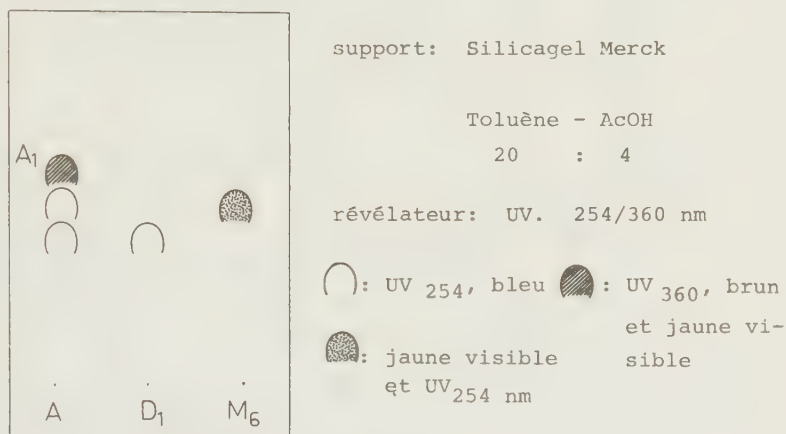


Fig. 8: Chromatogramme du précipité A

M_6 : β -orcine-carboxylate de méthyle

D_1 : acide évernique

La séparation des composés principaux peut se faire par sublimation (M_6 sublime à 150°C , A_1 à 210°C et D_1 ne sublime pas) ou par chromatographie sur sephadex LH20 (solvant: acétone). Cette dernière technique nous donne uniquement A_1 pur, tandis que les deux autres sortent sous forme de mélange avec beaucoup de A_1 (90%).

4.3. Isolement de la fraction acide B

L'extraction de E avec NaHCO_3 15% (voir schéma 4) conduit, après régénération à l'acide sulfurique 2N et réextraction à l'éther, à la fraction B. Après concentration, cette fraction est chromatographiée sur colonne de silicagel ($l=60$ cm, $d=4$ cm) et éluee avec un mélange: Ligroïne - AcOEt (8:2), jusqu'à (2:8). La fig. 9 montre la composition des fractions obtenues.

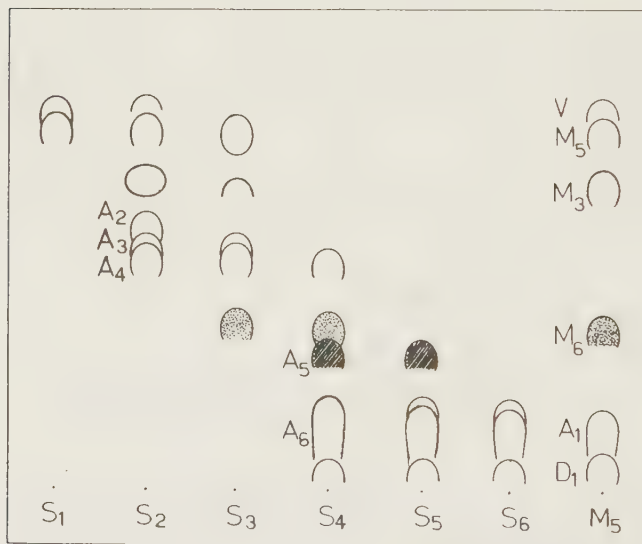


Fig. 9: Chromatogramme des fractions de la colonne S
(30 g d'extrait acide)

support: Silicagel Merck

solvant: Ligroïne - AcOEt (8 : 2)

révélateur: UV 254/360 nm

○ : bleu UV 254nm
 ● : jaune visible
 ■ : brun-rouge visible à UV 360nm
 ○ : rose-rouge visible, brun UV 360nm

Témoins: M₆: β-orcine-carboxylate de méthyle

D₁: acide évernique v: phthalate de dioctyle

D₂: atranorine

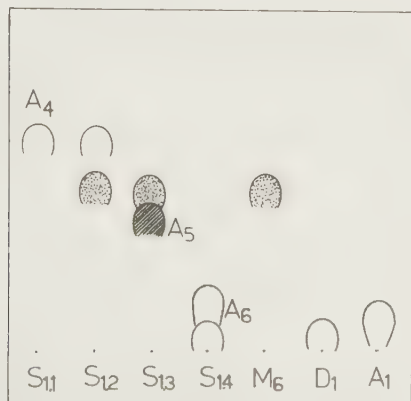
M₅: éverninate d'éthyle

A₁: témoin non identifié

Nous remarquons la présence, dans l'extrait de phthalate de dioctyle (provenant sûrement du procédé industriel d'extraction ou du stockage), de β-orcine-carboxylate de méthyle, d'atranorine et d'éverninate d'éthyle.

La fraction S₄ (2 g) qui semble contenir plusieurs substances intéressantes, est passée à nouveau sur silicagel (l=45 cm, d=4 cm) en éluant d'abord avec le mélange (Ligroïne - AcOEt 9:1). La polarité de l'éluant est augmentée progressivement jusqu'à AcOEt seul.

Des quatre fractions obtenues, une, S_{1,1}, est purifiée sur colonne sephadex (l=50 cm, d=4 cm) (MeOH). On obtient ainsi A₄ pur (fig. 10).



Support: Silicagel

Ligroïne-AcOEt (8:2)

Révélateur: UV 254 et 360 nm

Fig. 10: Chromatogramme de S₄ avec témoins

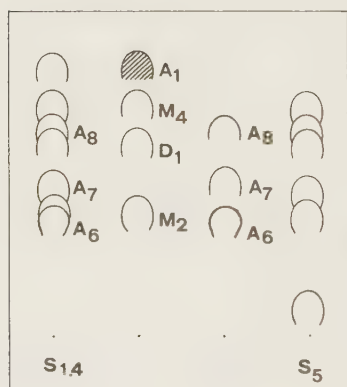
Pour séparer A_5 , nous avons traité $S_{1.3}$ sur colonne de cellulose ($l=50$ cm, $d=4$ cm) (AcOH 90%), M_6 ne migrant que très peu.

A_6 , comportant plusieurs produits, est plus compliqué à séparer. Comme notre premier système de solvant n'était pas du tout sélectif, nous avons choisi un mélange de solvants plus polaires pour $S_{1.4}$ et S_5 (fig. 11).

Support: Silicagel Merck

Toluène AcOH 20:4

Révélateur: UV et vanille + H_2SO_4



Support: Silicagel (Merck)

Solvant: Toluène-AcOH (20:4)

Révélateur: UV 254nm et
vanille + H_2SO_4

Fig. 11: Chromatogramme de $S_{1.4}$ et S_5 avec un autre solvant. Avec ce révélateur (vaniline = H_2SO_4) tous les spots apparaissent en rouge, sauf A_1  qui apparaît en bleu.

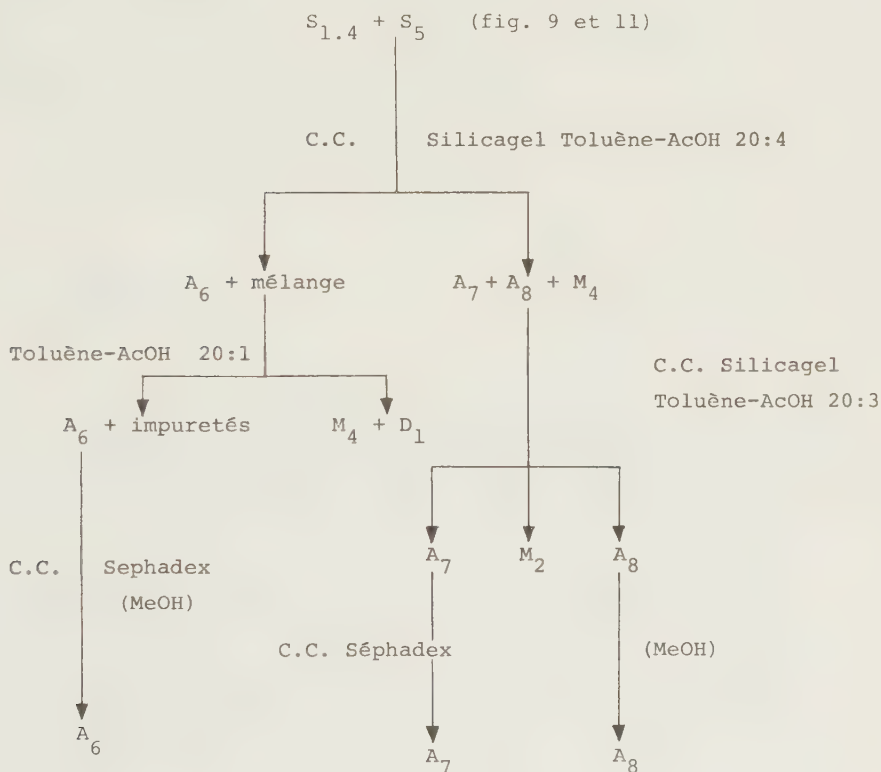
Témoins: M_2 : acide orsellinique

D_1 : acide éverniqu

M_4 : acide éverniquique

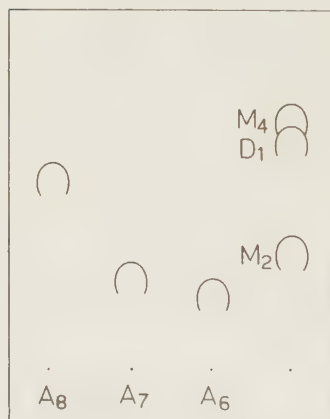
A_1 : témoin non encore identifié

A_6 , A_7 et A_8 sont séparés après passage sur plusieurs colonnes de silicagel (l=50 cm, d=3 cm) en variant les proportions de l'éluant Toluène-AcOH et après purification sur colonne de séphadex (MeOH) selon le schéma suivant.



SCHEMA 6

Le chromatogramme suivant (fig. 12) montre le résultat de ces différentes séparations.



support: Silicagel

Toluène-AcOH (20:4)

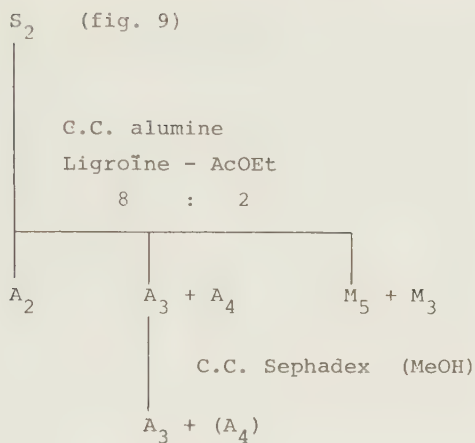
révélateur: vaniline + H_2SO_4
et UV_{254 nm}

Tous les spots sont révélés en rouge par le révélateur et à l'UV 254, ils apparaissent bleu.

Fig. 12: Chromatogramme des produits purifiés de $S_{1.4}$, S_5 et S_6

La fraction S_2 (fig. 9) nous montre, quoique difficilement, deux autres spots A_2 et A_3 , d'intensité très faible par rapport à A_4 .

Nous effectuons selon le schéma 7, une colonne d'alumine et nous obtenons d'abord une fraction contenant V, ensuite A_2 et A_3 , A_4 . Cette dernière fraction est purifiée sur sephadex LH20 avec du MeOH. A_3 contient toujours un peu de A_4 et même après plusieurs recristallisations (Hexane), il nous a été difficile d'obtenir A_3 pur, du fait de la très faible quantité (10 mg).



SCHEMA 7.

Ainsi, la fraction acide B de la concrète benzénique nous a permis d'isoler, en plus de l'acide évernique, de l'atranorine et des monoaryles connus, huit composés: A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, A₇, A₈.

4.4. Isolement de la fraction P

La deuxième méthode de séparation (schéma 4) consiste à passer l'extrait éthéré, libéré du précipité A, sur une colonne de terre à foulon (kieselguhr) (L: 60 cm, d: 4,5 cm); (Ligroïne - AcOEt 5:5) afin d'éliminer les pigments, la chlorophylle et les acides gras. Les quelques fractions (K) récoltées au bas de la colonne sont concentrées et réunies afin d'être introduites d'une part sur une colonne de Polyamide (25 g) (fig. 13), (éluant: MeOH : H₂O de 5:5 à 9:1) et, d'autre part 25 g sur une colonne de Silicagel, éluant (Toluène). La figure 13 donne une idée de la première séparation.

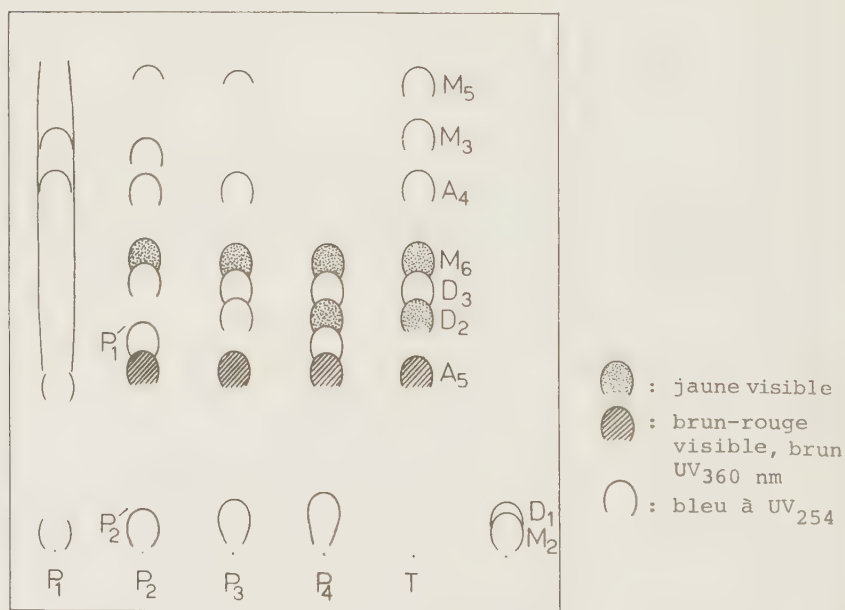
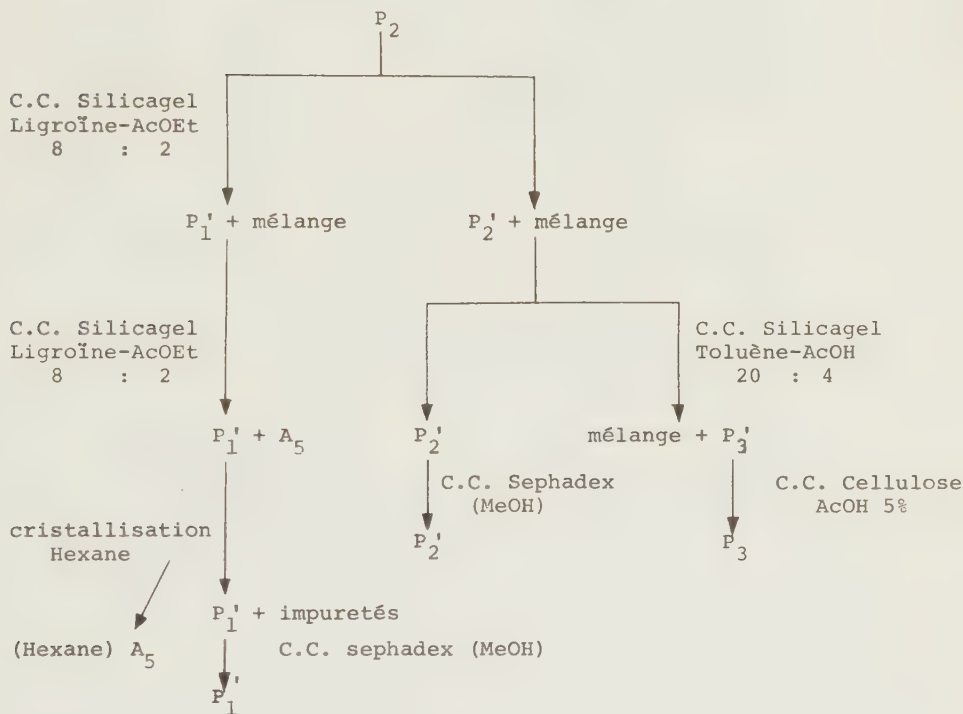


Fig. 13: Chromatogramme des fractions de la colonne de polyamide.

Support: Silicagel Ligroïne - AcOEt (8:2)

Révélateur: UV₂₅₄ et 360 nm

La fraction P_1 est constituée par un nombre élevé de composés volatils pouvant être séparés par chromatographie gazeuse. Le traitement de P_2 selon le schéma 7, nous permet l'isolement de P_1' , P_2' , P_3' (fig. 14).



SCHEMA 8

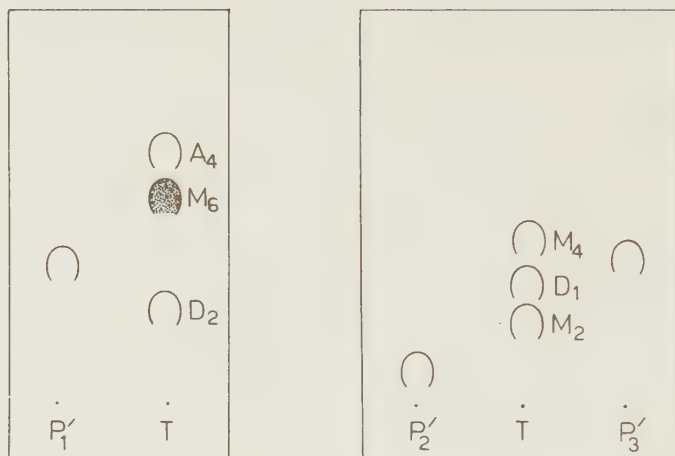


Fig. 14: Chromatogramme de P_1 et P_2

Support: Silicagel

Solvant: Ligroïne-AcOEt (8:2)

Révélateur: $UV_{254\text{ nm}}$

Silicagel

Toluène-AcOH (96:4)

$UV_{254\text{ nm}}$

4.5. Isolement de la fraction T

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, une partie de la fraction K (schéma 4) est introduite sur une colonne de silicagel (L: 60 cm, d: 4 cm) et éluée au Toluène. Nous obtenons les fractions suivantes (fig. 15).

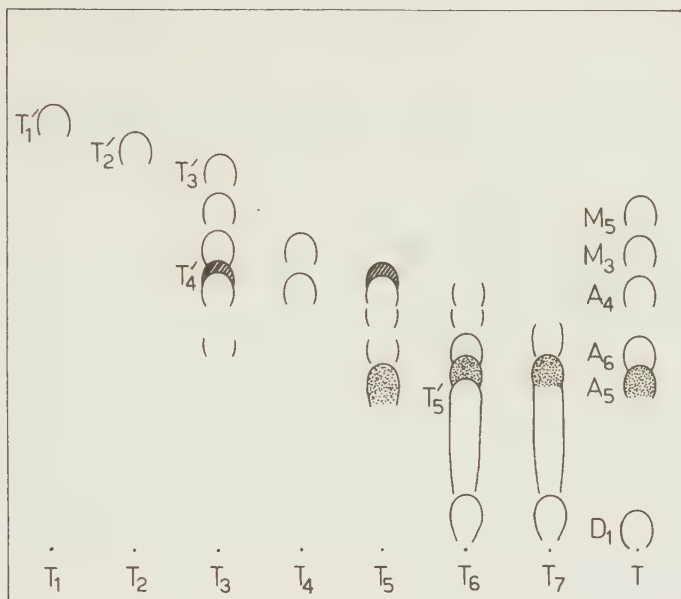


Fig. 15: Chromatogramme des fractions de la colonne silicagel

Support: Silicagel Ligroïne-AcOEt (8:2)

Révélateur: UV₂₅₄ nm

○: bleu UV₂₅₄ nm
 ●: brun-rouge visible, brun UV₃₆₀ nm
 ⊗: bleu, jaune UV₃₆₀ nm

T₅, T₆ et T₇ sont portés sur plaque silicagel avec un mélange de solvants plus polaires (Toluène-AcOH 20:4). T₇ sera analysé en chromatographie gazeuse.

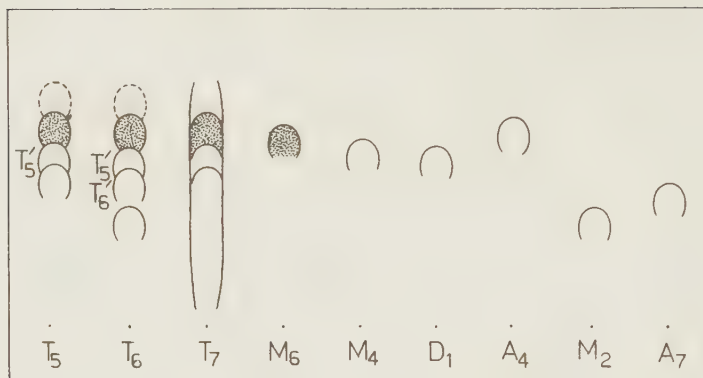
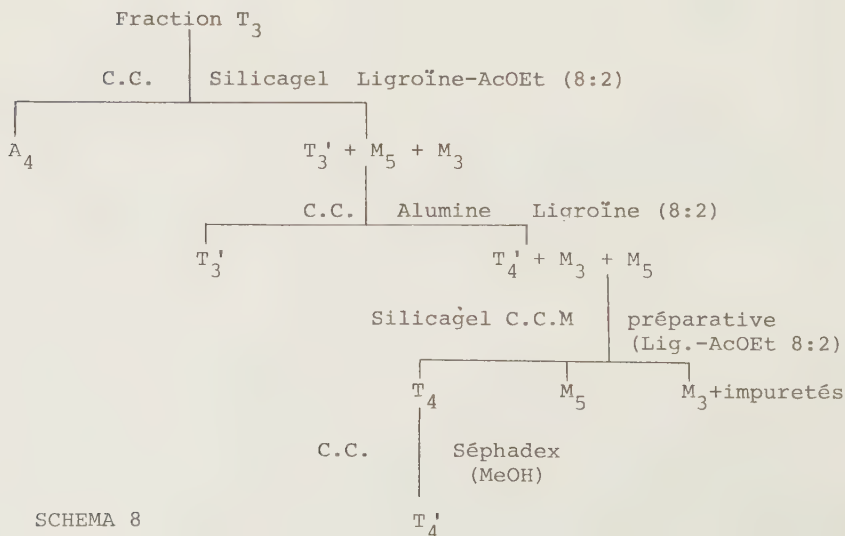


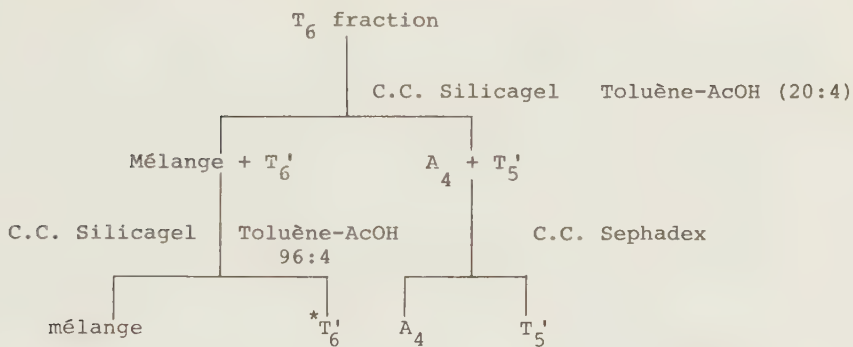
Fig. 16: Chromatogramme des fractions toluènes

Support: Silicagel
 Solvant: Toluène-AcOH 20:4
 Révélateur: UV₂₅₄ nm

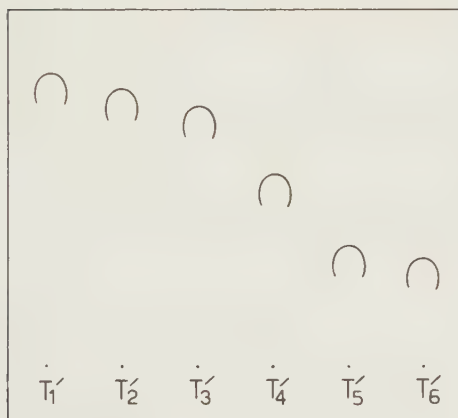
T₁' et T₂' sont recristallisés dans le méthanol alors que T₃' et T₄' sont séparés selon le schéma suivant:



T'₅ et T'₆ proviennent de deux passages successifs sur colonne silicagel de la fraction T'₆ :



SCHEMA 10



Support: Silicagel
 Solvant: Ligroïne-AcOEt (8:2)
 Révélateur: UV₂₅₄ et 360 nm

Fig. 17: Chromatogramme des produits T' de la fraction passée sur toluène

*note: T'₆ a été purifié par HPLC sur lichosorb Si 60, Toluène-dioxane-AcOH (50:10:5).

5. Identification des composés isolés par chromatographie liquide-liquide

5.1. Identification de A₁

A₁ se présente sous forme de cristaux jaunes en forme d'aiguille. F. 204°. A partir de 350 g de concrète industrielle, après séparation et recristallisation, nous en avons obtenu 50 gr. Il ne s'hydrolyse pas.

Son spectre de masse, et la comparaison avec la littérature [19], nous montre qu'il s'agit d'un dibenzofurane: l'acide us-
nique. Pour confirmer ce résultat, nous comparons aussi avec la littérature [18], les spectres IR et H¹-RMN.

Données Analytiques: $[\alpha]_D^{20} = + 320^\circ$ (benzène)

F=204°, recristallisé dans l'acétone.

UV: $\lambda_{\max} = 232, 282 \text{ nm}$

IR (KBr)cm⁻¹: 3400m, 3080f, 2920m, 1680ff, 1620ff, 1530ff, 1440ff, 1340-1360m, 1275ff, 1175ff, 1110m, 1050m.

¹H-RMN (DCCl₃) 60MHz: 1,8(s,3H,CH₃-C(11)), 2,15(s,3H,CH₃-C(8)), 2,7(s,6H,COCH₃ en 2 et 6), 6,05(s,1H-Ar), 12,75(s,1OH-Ar), 15,1(s,1OH-Ar C(7)). (Fig. 18).

SM (m/z, I%): 345(13,8), 344(M⁺ 53,7), 329(2,3), 301(2,0), 261(10), 160(60), 234(15,3), 233(100), 323(24,6), 217(20), 215(10,8), 191(10,8), 177(6,1), 159(7,7), 149(15,4), 137(10,8), 123(20), 111(15,4), 109(20), 97(21,5), 95(23), 85(20), 83(24,6), 81(26,1), 71(14,6), 69(35,4), 67(22), 57(58,4), 55(57), 43(41,5), 41(33,8).

m*: 207(260→232), 202,09(233→217), 196,5(344→260).

Tableau 1. Déplacements chimiques des atomes de carbone de l'acide usnique.

C(1)	C(2)	C(3)	C(4)	C(6)	C(7)	C(8)
198,19	179,43	155,10	(d) 98,29	109,51	157,64	104,02

C(9)	C(10)	C(11)	C(12)	C(13)
164,07	105,41	59,16	101,67	99,81

Déplacements chimiques des substituants

<u>CO-CH₃</u> (C2)	<u>CO-CH₃</u> (C2)	<u>CO-CH₃</u> (C6)	<u>CO-CH₃</u> (C6)	CH ₃ (C8)	CH ₃ (C11)
200.11	31,99	201,30	30,93	7,71	27,38

Le spectre "off-resonance" présente tout des singulets exception faite pour C(4) doublet et pour les groupes méthyles: quadruplets. L'assignation des différents signaux a été faite, à l'aide du spectre "off-resonance" et du calcul théorique des déplacements chimiques des atomes de carbone aromatiques, d'après les règles d'additivité [22].

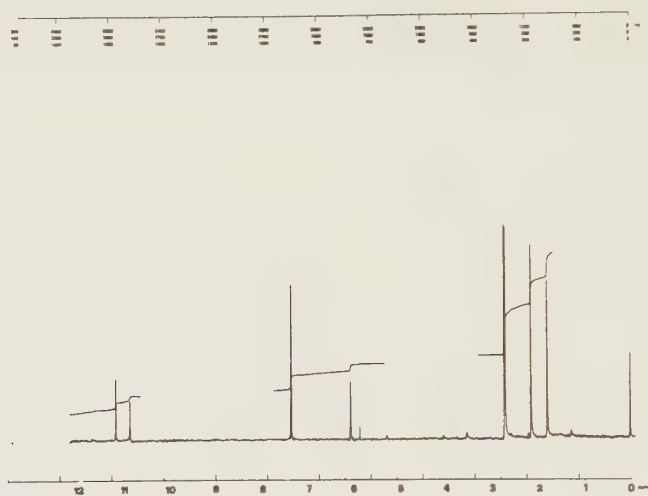


Fig. 18: Spectre ^1H -RMN de A_1

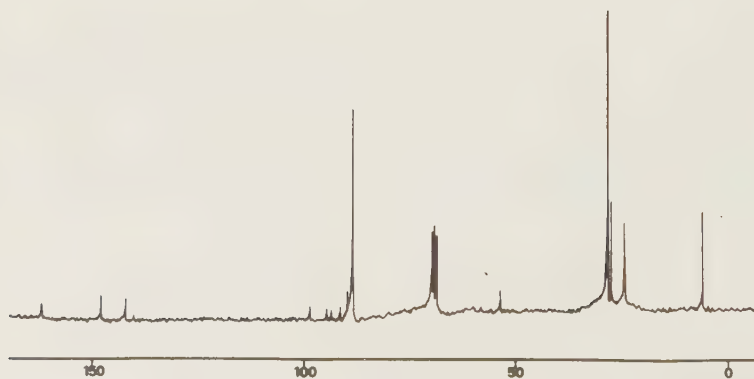
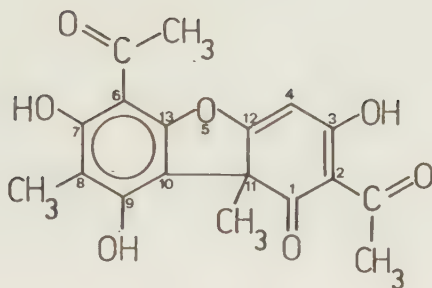


Fig. 19: Spectre ^{13}C -RMN de A_1



Acide usnique

5.2. Identification de A₂

A₂ se présente sous forme de cristaux incolores 50 mg, recristallisés dans le méthanol. F. 254-256°. $[\alpha]_D^{25} = -25^\circ$ (C=0,32 CHCl₃).

Le spectre IR montre plusieurs groupes méthyles et méthylènes à 2920-2870 cm⁻¹, et une fonction carbonyle à 1700 cm⁻¹. L'ensemble du spectre fait penser à un triterpène.

Le spectre RMN du proton (fig. 20) nous montre la présence de plusieurs méthyles et méthylènes.

Le spectre de masse M⁺ à 426 (voir fig. 21) et la littérature [20], nous ont permis d'identifier A₂ comme étant la friedeline.

IR (KBr) cm⁻¹: 2920ff, 2870ff, 1700ff, 1640m, 1450m, 1380m, 1365f.

¹H-RMN (DCCl₃, 100 MHz): 0,73(3H), 0,88(3H), 0,92(3H), 0,96(3H), 1,01(3H), 1,18(3H), 1,27(3H).

SM (m/z , I%): 427(31), 426(M^+ 100), 412(5,7), 411(20), 341(11,4), 303(18,5), 302(42), 287(14,3), 275(21), 274(42), 273(64), 259(8,5), 257(8,5), 248(28), 246(35,7), 234(18), 233(19,5), 232(45), 231(30), 220(21), 219(18), 218(50), 217(22,8), 206(27), 205(71), 204(25), 193(15), 191(28), 179(57), 177(21), 163(54), 161(31), 151(22,8), 150(21), 149(35,8), 137(57), 135(45), 133(28,5), 125(63), 123(63), 121(57,3), 109(85), 107(57), 95(91), 81(36), 69(98), 67(57), 57(57), 55(91), 43(85), 41(81).

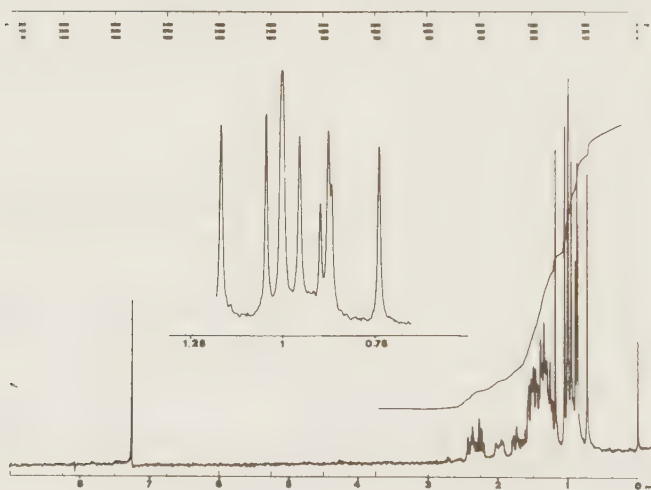


Fig. 20: Spectre ^1H -RMN de A_2 .

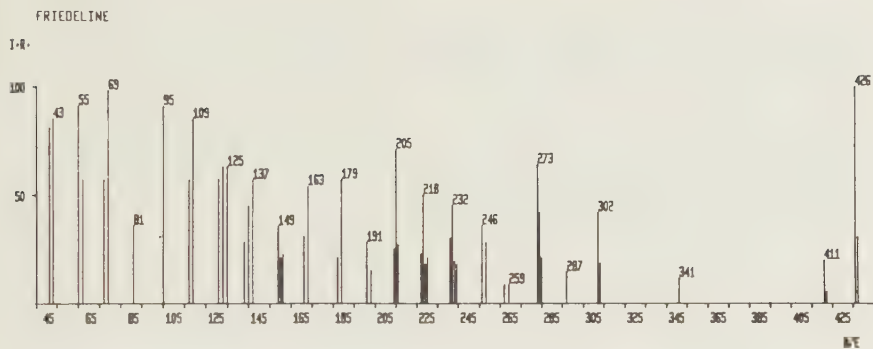
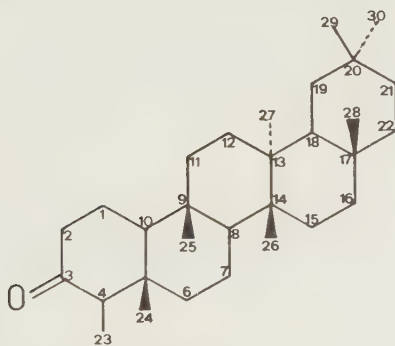


Fig. 21: Spectres de masse de A₂



Friedeline

5.3. Identification de A₃

A₃ a été isolé en très faible quantité (10 mg) et n'a pu être purifié totalement. Nous avons quand même pu effectuer une analyse spectrale complète.

F. 190°. $[\alpha]_D^{25} = +50$ (C=0,03 CHCl₃)

IR (KBr) cm⁻¹: 2940-2850ff, 1725ff, 1650m, 1410ff, 1380ff.

D'après ce spectre, nous pouvons déduire la présence d'une fonction cétonique et de groupes méthylènes et méthyles aliphatiques. L'allure générale du spectre IR comme A₂ nous laisse supposer un triterpène.

Le spectre ¹H-RMN (fig. 22) confirme les données ci-dessus. On observe 7 groupes méthyles, dont 6 cyclo-aliphatiques et un sur une double liaison.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 0,72(s,3H,3H-C(28)), 0,88(s,3H,3H-C(25)), 0,89(s,3H,3H-C(27)), 1,02(s,6H,3H-C(24) et 3H-C(26)), 1,04(s,3H,3H-C(23)), 1,06-1,56(m,24H), 1,6(s,3H,3H-C(29)), 4,69(s,2H,2H-C(30)).

Le spectre de masse (fig. 23) donne les fragments caractéristiques des triterpènes [20] (schéma 11). En particulier, sont importants le pic de base à m/z 189 et le pic intense à m/z 205, correspondant à la scission du cycle C.

En comparant nos résultats spectroscopiques avec ceux existants dans la littérature [21], nous concluons qu'il s'agit de la moretenone.

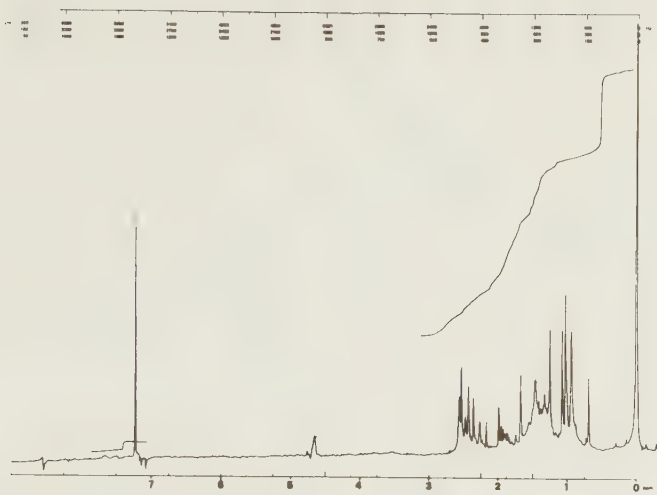


Fig. 22: Spectre ^1H -RMN de A_3

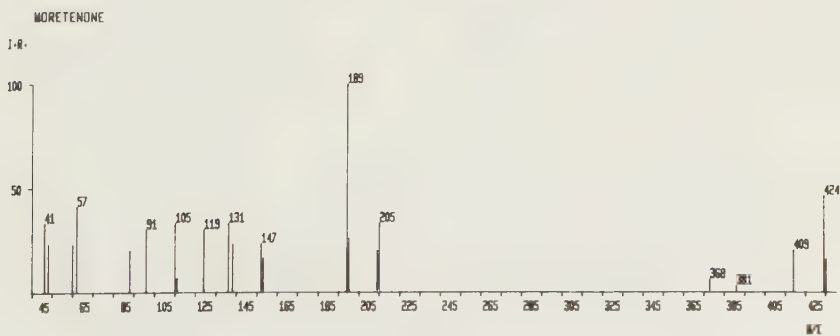
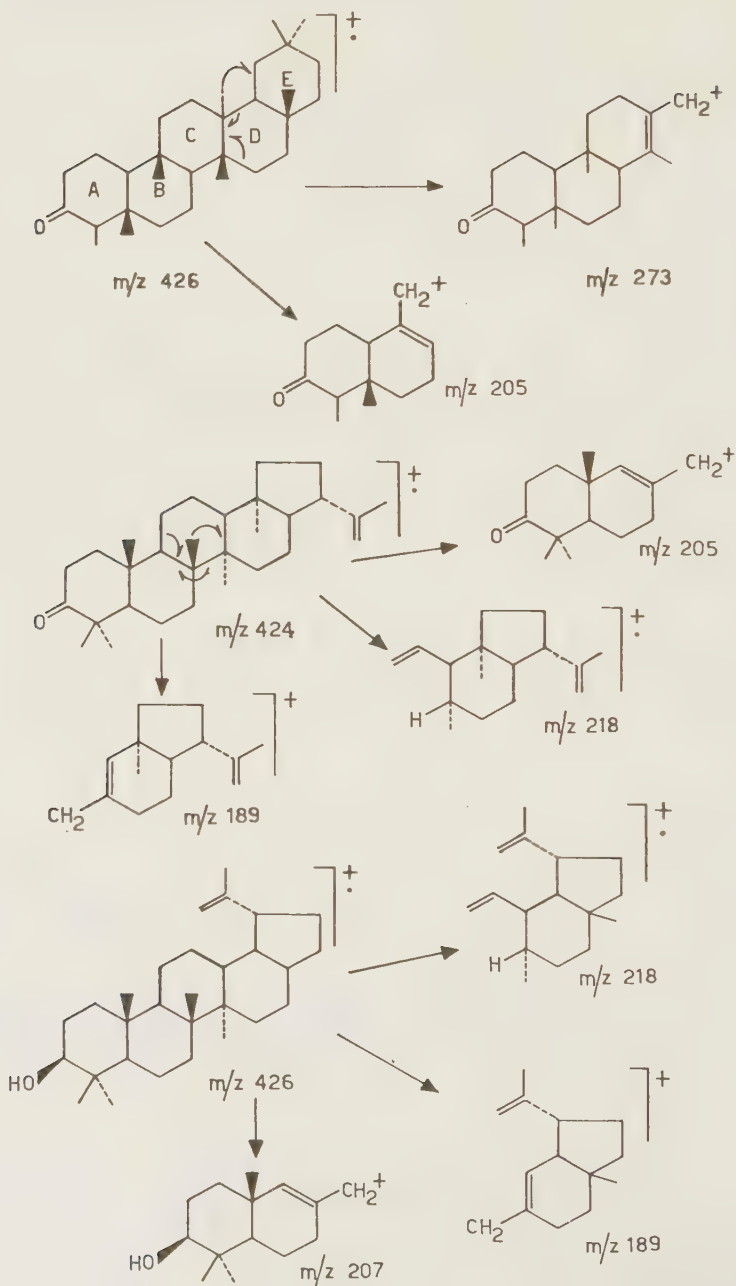
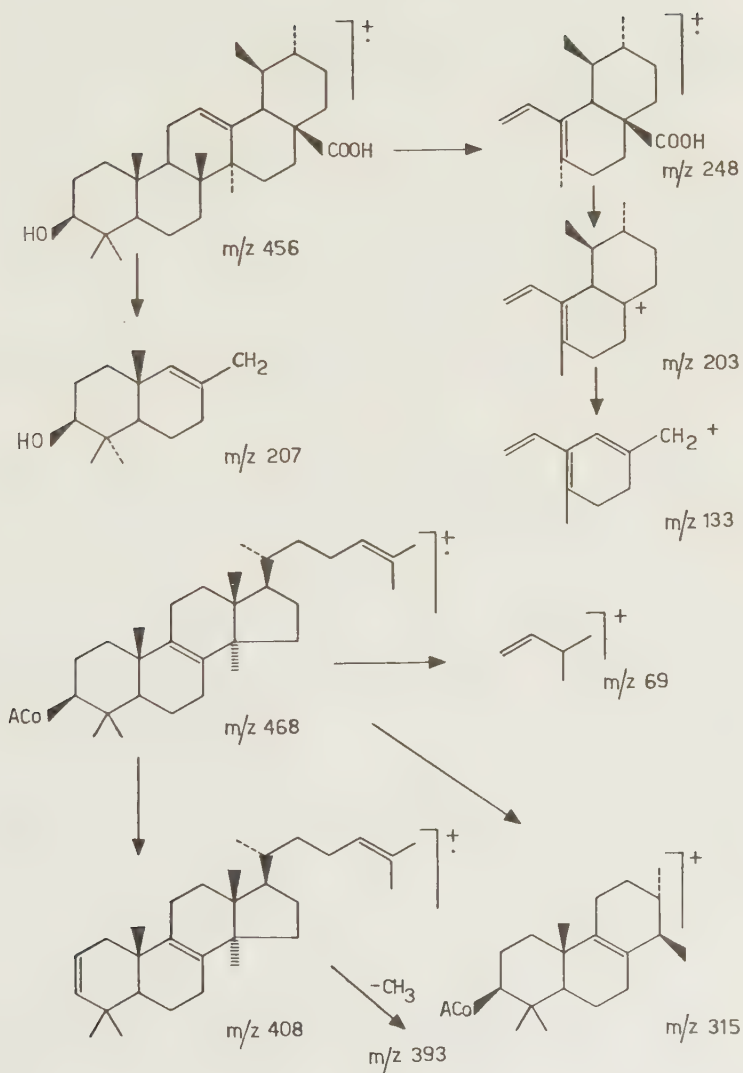


Fig. 23: Spectre de masse de A_3

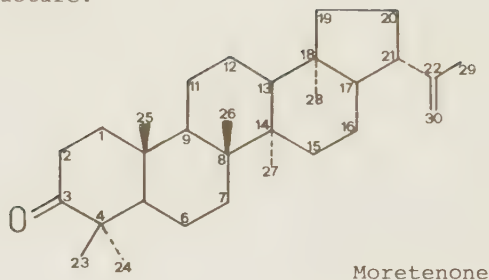
SCHEMA 11: Fragmentation de triterpènes



SCHEMA 12:



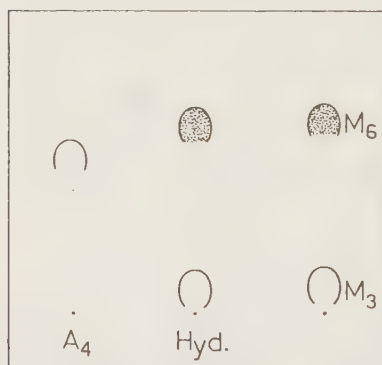
Structure:



5.4. Identification de A_4

Isolé en assez grande quantité (100 mg), nous avons pu le caractériser de différentes façons.

5.4.1. Hydrolyse de A_4 (avec KOH)



Support: Silicagel

Solvant: Ligroïne-AcOEt 8:2

Révélateur: UV 254 nm

Fig. 24: Chromatogramme de A_4 hydrolysé

Nous constatons qu' A_4 s'hydrolyse pour donner un acide et un phénol. Nous pensons donc à un depside.

Le spectre IR de A_4 présente les bandes caractéristiques des depsides et montre en particulier la présence de groupes hydroxyles en ortho d'une ou de deux fonctions carbonyles (ν (CO) = 1640 cm^{-1}). (Fig. 25).

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ (60 MHz) présente neufs singulets dont les déplacements chimiques correspondent soit au cycle S de l'acide, soit au cycle A de l'alcool. Le groupe méthyle à 2,13 ($\text{CH}_3\text{-C}(3')$) apparaît toujours plus bas que les autres (2,68 $\text{CH}_3\text{-C}(6)$ et 2,57 $\text{CH}_3\text{-C}(6')$) dans le cycle A, type β -orcinol. Dans cette position, à cause de la stéréochimie de la molécule (voir dessin), ce méthyle se trouve entre deux carbones portant des restes oxygénés et est ainsi blindé (Fig. 26). Pour les autres signaux (3,99 $\text{OCH}_3\text{-C}(4)$) et 6,42(s, $\text{H-C}(5\text{ et }3)$), 6,58(s, $\text{H-C}(5')$) leur déplacement ne présente pas de problème particulier.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 60 MHz): 2,13(s, $\text{CH}_3\text{-C}(3')$); 2,57(s, $\text{CH}_3\text{-C}(6')$); 2,68(s, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$); 3,85(s, CH_3CO); 3,99(s, CH_3COOC); 6,42(s, $\text{H-C}(5+3)$); 6,58(s, $\text{H-C}(5')$); 11,50(s, 1H, OH-Ar); 11,97(s, 1H, OH-Ar).

Le spectre $^{13}\text{C-RMN}$ (22,63 MHz) de A_4 confirme les données précédentes, en particulier pour le carbone du méthyle en $\text{C}(3')$, qui apparaît anormalement bas à 9,31, par rapport à un CH_3 sur un cycle aromatique.

L'attribution des différents signaux a été faite d'une part à l'aide des spectres "off resonance", d'autre part d'après les règles d'additivité [22] et par comparaison avec les spectres $^{13}\text{C-RMN}$ de l'atranorine (D_2) et des dérivés monoarylés (β -orcin-carboxylate de méthyle (M_6) et de l'éverninate de méthyle (M_3). (Voir tableau 2 et fig. 27).

La fragmentation en spectrographie de masse de l'évernine (schéma 12) confirme la nature des cycles A et S du depside A_4 .

Tableau 2. Déplacements chimiques des atomes de carbone dépsidiques¹⁾

	C (1)	C (2)	C (3)	C (4)	C (5)	C (6)	C (7)
A ₄	104,28	162,92	99,02	164,93	111,88	143,50	169,86
D ₂	104,51	163,50	84,15	163,00	112,90	149,00	169,01
M ₃	104,87	163,47	98,37	165,00	110,52	142,55	171,50

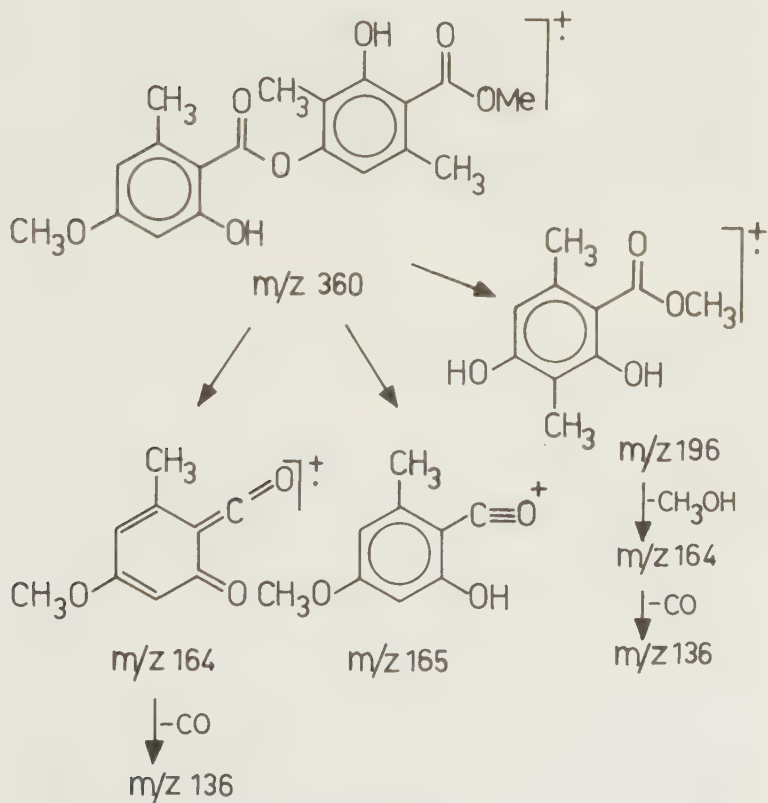
	C (1')	C (2')	C (3')	C (4')	C (5')	C (6')
A ₄	116,42	152,59	110,06	166,68	116,94	139,67
D ₂	115,80	152,07	110,50	166,00	116,90	140,01
M ₆	109,00	158,67	105,20	163,28	110,70	140,08

Déplacements chimiques des substituants¹⁾

	CHO-C (3)	CH ₃ O-C (4)	CH ₃ -C (6)	COO-C (1')	COOCH ₃	CH ₃ -C (3')	CH ₃ -C (6')
A ₄		55,38	23,96	172,33	52,14	9,35	24,67
D ₂	193,69		21,10	172,00	51,00	9,40	24,00
M ₆				172,25		7,72	24,10

¹⁾ Spectres enregistrés à 22,63 MHz dans CCl₃ (δ en ppm par rapport au TMS).

SM (m/z , I%): 361(8), 360(M^+ 39), 328(8), 197(15), 196(55), 179(3,1), 166(47), 165(100), 164(100), 163(18), 137(23), 136(89), 135(31), 122(5), 121(8), 110(26), 109(26), 108(18), 107(36), 94(10), 93(10), 79(32), 77(34), 69(15,7), 67(18), 65(18), 55(18), 43(15,2), 41(14,4). m^* : 163,17(196+179), 137,22(196+164), 112,78(164+36), 106,71(360+196).



SCHEMA 12.

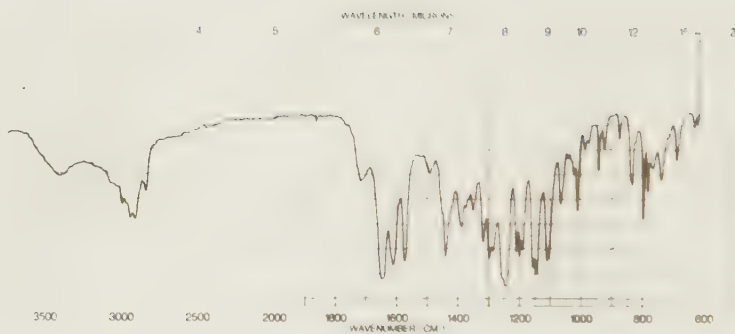


Fig. 25: Spectre IR de A₄

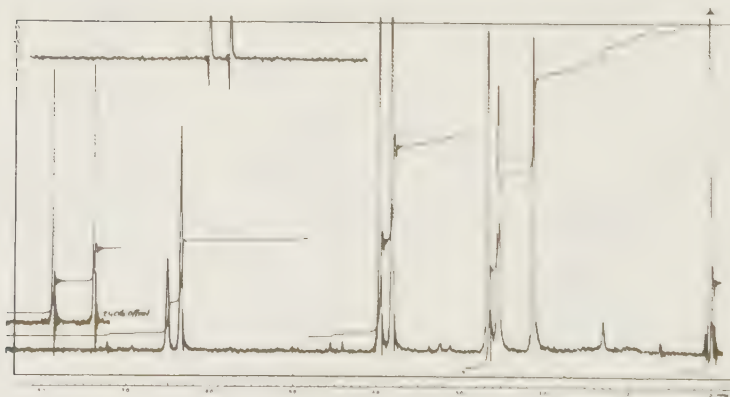


Fig. 26: Spectre ¹H-RMN de A₄

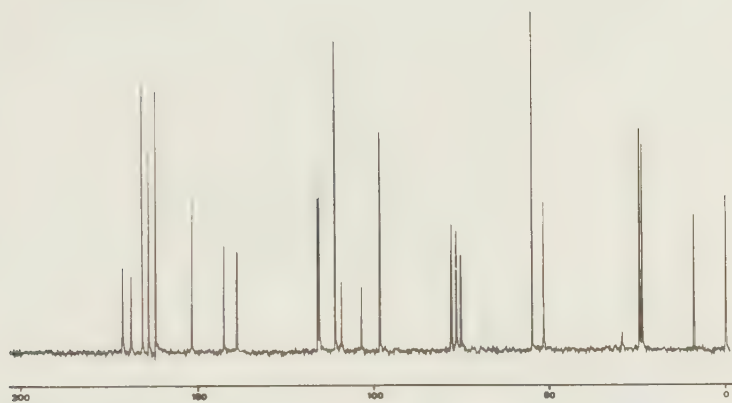


Fig. 27: Spectre ^{13}C -RMN de A_4

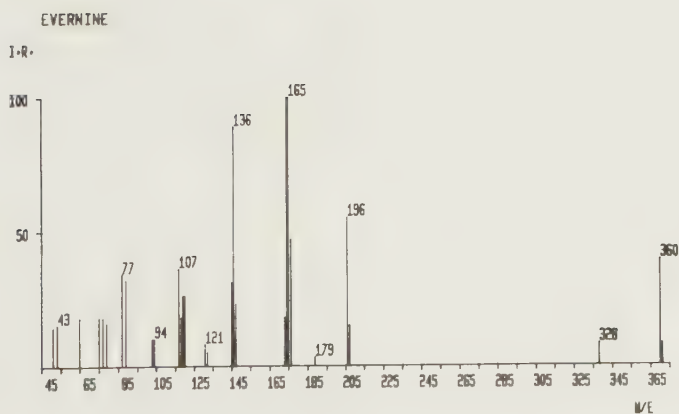
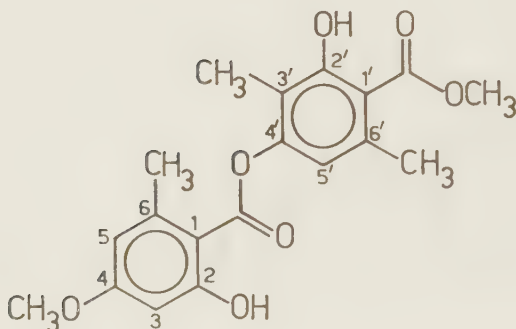


Fig. 28: Spectre de masse de A_4

La structure trouvée sera confirmée, par synthèse (voir chapitre 8).



Evernine

5.5. Identification de A₅

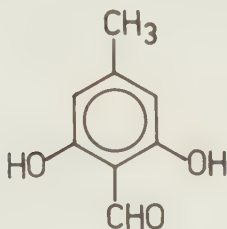
Ce composé isolé en assez grande quantité (200 à 400 mg), jaune, a été recristallisé dans: Ligoïne/Benzène. Après une rapide analyse chromatographique et spectrale, nous trouvons qu'il s'agit de l'atranol (M₁₀), composé déjà connu [4 - 6].

Données analytiques: F = 129° UV: $\lambda_{\max}$ 225, 282, 350.

IR (cm⁻¹): 3300-3000ff, 1650ff, 1600ff, 1500m, 1380f, 1350f, 1270m, 1200m, 1080m, 840m, 700ff.

¹H-RMN (DCCl₃, 60 MHz): 2,27(s, 3H, CH₃-Ar), 6,23(s, 2H, H-Ar), 8,78(s, 2H, OH-Ar), 10,28(s, 1H, CHO).

SM (m/z, I%): 152(M⁺ 86), 151(100), 134(6), 95(10), 78(6), 77(15), 76(4), 57(16), 55(10), 51(16), 43(26), 41(27).

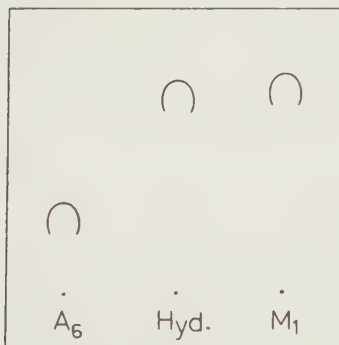


Atranol

5.6. Identification de A₆

Ce composé cristallin, incolore, est présent en petite quantité (100 mg).

Le test au chlorure ferrique [23] nous renseigne sur sa nature depsidique. De plus, son comportement chromatographique (très retenu) nous fait penser à un acide. Nous effectuons l'hydrolyse:



Support: Silicagel
Solvant: Toluène-AcOH 20:4
Révélateur: UV 254 nm

Fig. 29: Chromatogramme de A₆ hydrolysé

L'hydrolyse avec KOH méthanolique nous montre un déplacement de Rf assez important. Supposant la présence de groupes phénoliques, nous avons acétylé A₆ et effectué le spectre ¹H-RMN qui nous confirme la présence de trois hydroxyles. Ce même spectre (90 MHz) nous montre le couplage méta J=2Hz de protons des cycles S et A.

¹H-RMN du produit acétylé (DMSO (D₆) 270 MHz): 2,18(AcO-C(4)), 2,20(AcO-C(2')), 2,27(AcO-C(2)), 2,34(CH₃-C(6)), 2,49(s, 3H, CH₃-C(6')), 6,10-6,17(1H, H-Ar), 6,76-6,77(1H, H-Ar), 6,98-7,0(1H, H-Ar).

Le spectre du proton de A₆ est donné dans la figure 31.

¹H-RMN (DMSO (D₆) 60 MHz): 2,35(s, 6H, CH₃-C(6), CH₃-C(6')), 6,2 et 6,6(s, 4H, H-Ar).

Le spectre IR de A₆ (fig. 30), présente deux bandes intenses à 3530, ν -OH libre et 3450, ν -OH associé, caractéristiques pour un depside ayant trois hydroxyles en 2,4 et 2' et une bande large de 2900-3200 (ν -OH polymère) dû à la présence de l'hydroxyle en 2' en position ortho par rapport au carbonyle de l'acide (1'). Le spectre ¹³C-RMN (voir fig. 32) mentionné dans le tableau [4] corrobore nos résultats précédents.

La fragmentation de cette molécule en spectrographie de masse nous montre des fragments internes stables, donc correspondant à la rupture de la liaison depsidique (voir fig. 33). M⁺ est par contre absent.

SM (m/z, I%): M⁺ 312(1), 151(36), 150(86), 149(30), 125(53), 124(100), 123(98), 122(81), 109(68), 107(72), 96(22), 95(36), 94(54), 53(36).

Ces données nous permettent de conclure que A_6 correspond à l'acide lécanorique dont la présence dans les lichens est bien connue [14]. Pour confirmer cette structure, nous avons effectué la synthèse de A_6 (voir chapitre 8.).

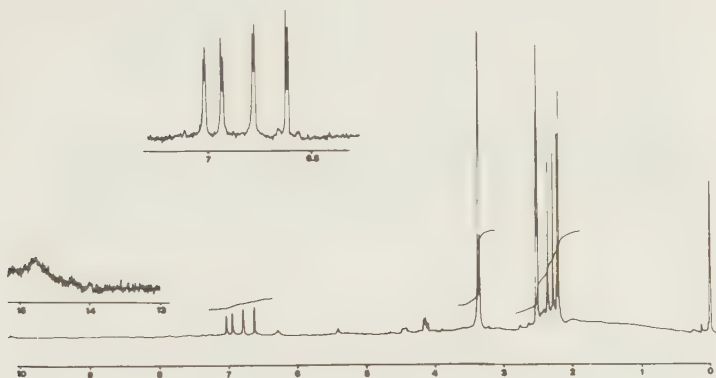


Fig. 30: Spectre ^1H -RMN de A_6 acétylé

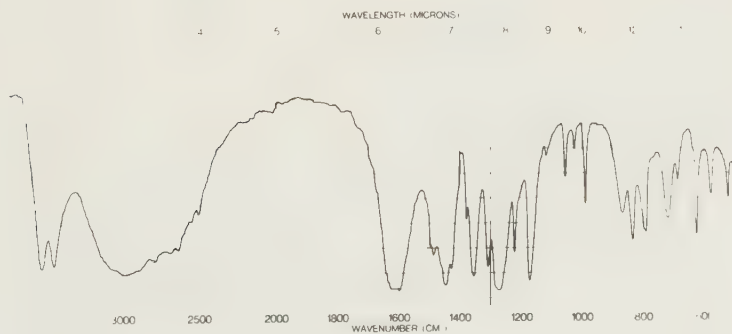


Fig. 31: Spectre IR de A_6

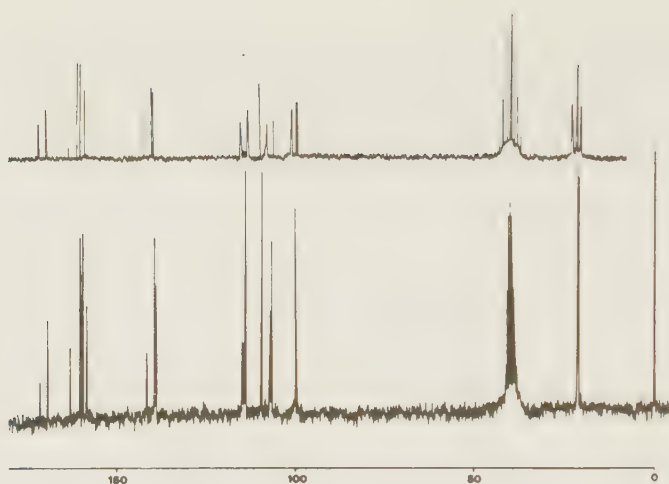


Fig. 32: Spectre ^{13}C -RMN de A_6

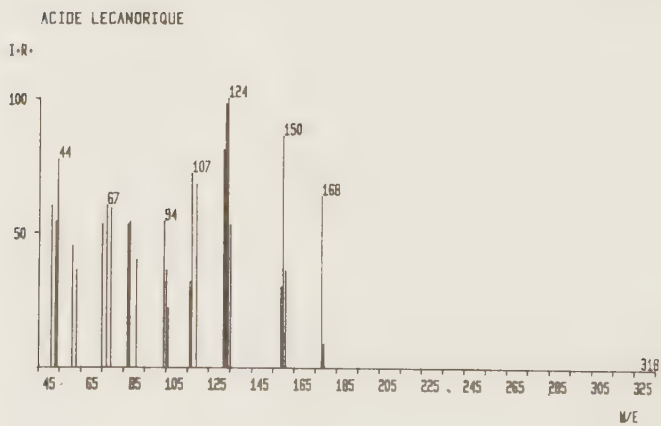
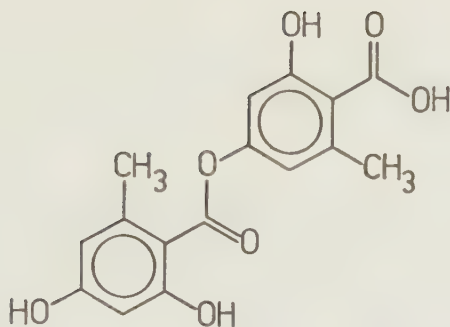


Fig. 33: Spectre de masse de A_6

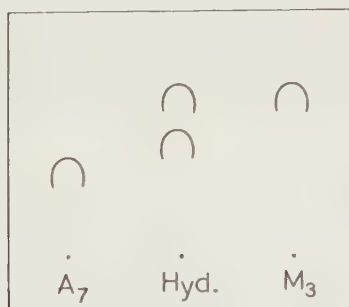


Acide lécanorique

5.7. Identification de A₇

Nous avons isolé 100 mg de cristaux incolores, recristallisés dans: Ligroïne/Acétate d'éthyle. F. 162°.

A₇ réagit positivement aux tests des depsides avec FeCl₃ et s'hydrolyse en milieu KOH méthanolique pour donner le sparassol et un autre composé monoarylique inconnu (fig. 34).



Support: Silicagel
Solvant: Toluène-AcOH 20:4
Révélateur: UV 254 nm

Fig. 34: Chromatogramme de A₇ hydrolysé

Le spectre UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ 300, 267-270, 230 nm, présente les mêmes absorptions que les pardepsides et le spectre IR (voir figure 35) montre les bandes caractéristiques et, de plus, une absorption à 1680 cm⁻¹ (ν C=O) correspondant probablement à un acide ou un ester) qui ne semble pas associé contrairement à l'acide lécanorique et à l'évernine vus précédemment.

Le spectre ^1H -RMN (voir fig. 36) présente également des déplacements similaires, à noter toutefois, la différence de $\sim 0,2$ ppm entre les groupes méthyles des positions 6 et 6'.

^1H -RMN (DMSO (D_6), 60 MHz): 2,22 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$), 2,40 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6')$), 3,75 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{O-C}(4)$ et $\text{CH}_3\text{O-C}(2')$), 6,35 (s, 2H, H-Ar), 6,75 (s, 2H, H-Ar), 10,45 (s, 1H, OH).

Le spectre ^{13}C -RMN (voir figure 37 et tableau 4) montre une différence importante par rapport à A_4 et A_6 pour $\text{C}(1')$ (+75Hz) due à la rupture de la liaison hydrogène entre le groupe carboxyle en (1') et le méthoxy en (2').

Cette même cause doit être responsable des modifications des déplacements pour les atomes de carbone (0,5 à 1,5 ppm) du cycle S.

Au vu de ces résultats et des fragments observés en spectrographie de masse 165 et 138, nous proposons la structure de l'acide O-méthyl-2' évernique, dont nous effectuons la synthèse (voir chapitre 8).

SM (m/z , I%): 302 (M^+ , 3), 182 (12), 166 (9), 165 (78), 164 (26), 139 (8), 138 (100), 137 (12), 136 (17), 124 (15), 109 (50), 108 (30), 107 (48), 95 (20), 94 (12), 93 (26), 79 (20), 78 (12), 77 (26), 65 (20), 44 (73), 39 (52). (Fig. 38).

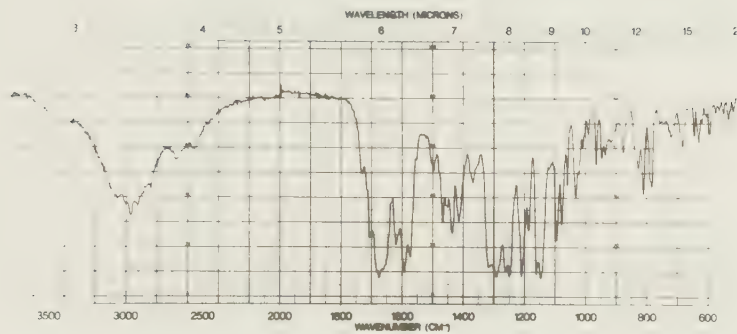


Fig. 35: Spectre IR de A₇

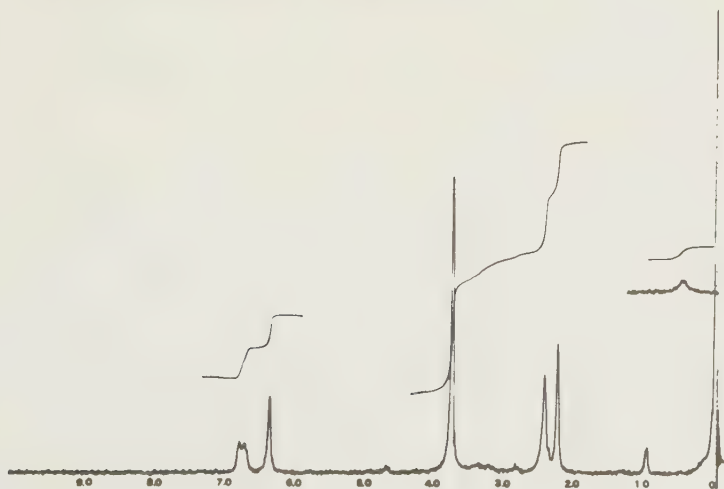


Fig. 36: Spectre ¹H-RMN de A₇

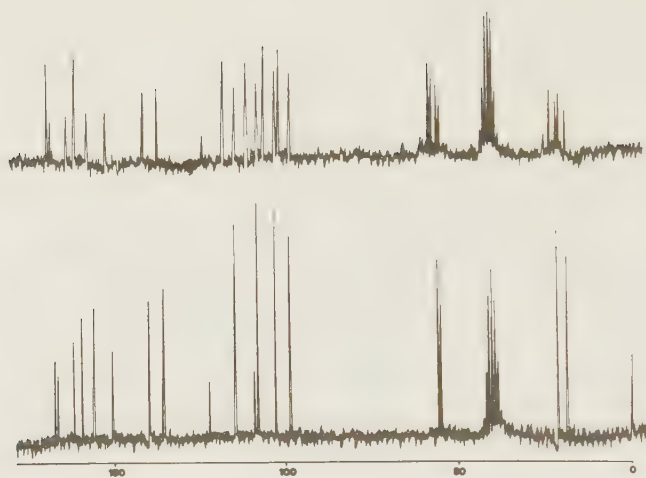


Fig. 37: Spectre ^{13}C -RMN de A_7

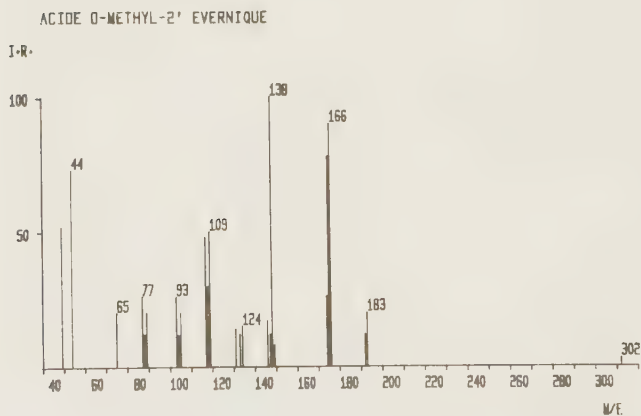
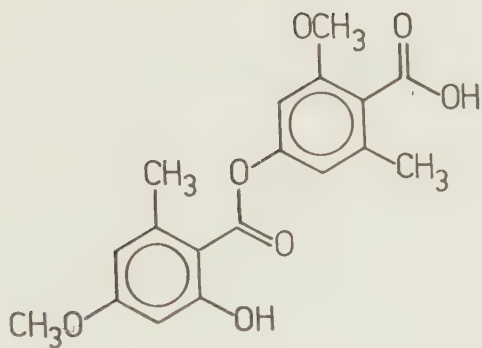


Fig. 38: Spectre de masse de A_7



Acide O-méthyl-2'-évernique

5.8. Identification de A₈

Isolé sous forme de cristaux blancs (100 mg), F: 170 d.
Le test au chlorure ferrique [23] ainsi que le spectre UV,
 λ_{max} (MeOH): 228, 264, 298 nm, indiquent qu'il s'agit d'un
depside.

Le comportement de A₈ à l'hydrolyse nous permet d'identifier
l'unité S comme étant l'acide éverninique.

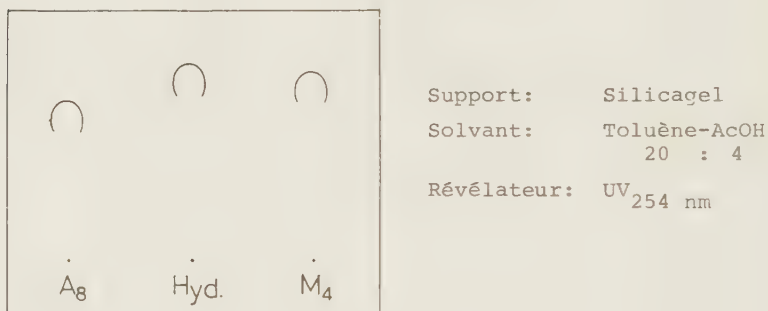


Fig. 39: Chromatogramme de A₈ hydrolysé.

Le spectre IR de A₈ (fig. 40) nous montre la présence d'hydroxyles depsidiques et d'acides aromatiques. L'absorption à 1630 cm⁻¹ (ν C=O) est faible, comparativement à celle des autres depsides. Ceci laisse supposer une conjugaison ou une association entre la fonction carboxylique et un ou deux hydroxyles voisins de l'acide. Les autres bandes sont semblables à celles des depsides déjà rencontrés.

Le spectre RMN-¹H a des caractéristiques très intéressantes:
- effectué dans l'acide trifluoroacétique (fig. 41a), il présente des déplacements normaux par rapport aux autres depsides pour les groupes méthyles, méthoxyles et protons aromatiques.

^1H -RMN de A_8 (a) (CF_3COOH) 60 MHz: 2,3(s,3H, CH_3 -Ar), 2,35(s,3H, CH_3 -Ar), 4,05(s,3H, OCH_3 -Ar), 4,13(s,3H, OCH_3 -Ar), 6,65(s,2H,H-Ar).

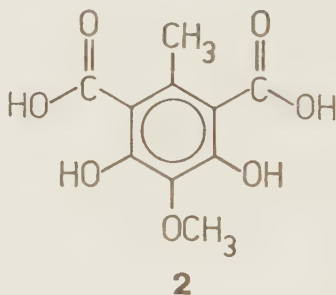
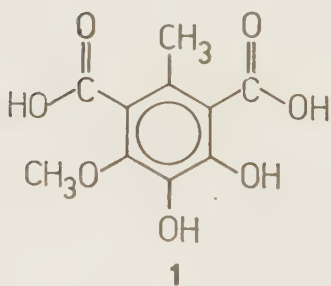
Par contre dans le diméthyle sulfoxyde, certains de ces déplacements sont très différents (fig. 41b). Un des deux groupes méthyles et méthoxydes aromatiques se trouvent très blindés: 1,7 ppm et 3,1 ppm, alors que les valeurs normales se situent entre 2,2-2,5 et 3,7-4 ppm.

^1H -RMN de A_8 (b) (DMSO) 90 MHz: 1,75(s,3H, CH_3 -Ar), 2,5(s,3H, CH_3 -Ar), 3,2(s,3H, OCH_3 -Ar), 3,3(signal large, 1H, OH-Ar), 3,75(s,3H, OCH_3 -Ar), 4,1(signal large, 1H,OH-Ar), 6,05(dxd,2H,J=2Hz couplage méta, H-Ar), 16,3(signal large, H acides).

La comparaison des deux spectres nous permet de supposer que le solvant (acide trifluoracétique) rompt les liaisons hydrogènes intermoléculaires ou intramoléculaires et, par conséquent. la résonance des protons impliqués dans ces liaisons est modifiée.

Comme nous connaissons le cycle S par l'hydrolyse, et que nous savons qu'aucun proton aromatique ne se trouve sur le cycle A, nous pouvons dire que ce dernier est hexasubstitué; le méthoxyde sur ce cycle, pour être blindé, doit être empêché stériquement par les substituants des carbones voisins, probablement des restes oxygénés. De même, le groupe méthyle du cycle A est aussi blindé par la présence de carbonyles qui ne peuvent être que ceux des acides devant se trouver sur le même cycle. De plus, en tenant compte de l'infrarouge (faible absorption des carbonyles), nous pouvons ajouter que les deux fonctions acides doivent être associées entre elles ou avec un hydroxyle voisin.

Le spectre ^{13}C -RMN (fig. 42, tableau 3) nous apporte une confirmation et un complément aux renseignements tirés des spectres du proton. Ainsi, les mêmes remarques peuvent être faites concernant le déplacement chimique du carbone du groupe méthoxyle, abaissé à 46 ppm, alors que la valeur normale est voisine de 54 ppm. De plus, on peut dire que le groupe méthyle du cycle A n'est pas en ortho de la liaison ester liant les deux cycles, puisqu'on n'observe pas la valeur de 9,31 ppm comme c'était le cas pour un autre depside: A_4 . Ce méthyle pourrait par contre se trouver entre deux fonctions acides. Ceci nous amène à proposer, pour le cycle A, les structures suivantes:



Le calcul théorique des déplacements chimiques des atomes de carbones aromatiques d'après les règles d'additivité [22] confirme bien les valeurs expérimentales obtenues et la position des substituants. De plus, nous pensons à la structure 2 car l'abaissement du déplacement du carbone du méthoxyle en ^{13}C -RMN (48,61 au lieu de 55,64) peut justifier sa position entre deux groupes hydroxyles. En effet, on constate une analogie entre l'abaissement du déplacement du carbone du méthyle placé entre deux hydroxyles (vu plus haut) et notre cas du méthoxyle.

Tableau 3. Déplacements chimiques des atomes de carbone
depsidiques

C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7
111,1	159,77	98,0	164,08	107,0	141,71	174,30

C'_1	C'_2	C'_3	C'_4	C'_5	C'_6
119,0	*	141,71	144,2	111,1	*

Déplacements chimiques des atomes de carbone des substituant

$CH_3-C(6)$	$C(6')$	$OCH_3-C(4)$	$C(3')$	$COOH-C(1')$	$C(5')$
23,75	23,25	55,64	48,61	177,56	177,57

* Le temps de relaxation de certains carbones quaternaires du cycle A étant très faible, il n'est pas possible, vu le spectre et la comparaison avec le calcul théorique des déplacements, d'attribuer une valeur à ces deux carbones (par calcul : $C'_2 = 149,7$ et $C'_6 = 127,9$ ppm).

SM (m/z , I%): 406(M^+), 198(1), 180(3,3), 167(2), 166(16), 165(3,6), 164(0,6), 153(12), 152(60), 151(15), 150(1,5), 149(3,6), 139(12), 138(60), 137(20), 135(6), 124(9), 123(42,4), 122(21,2), 121(24,2), 109(42,4), 108(36,3), 107(39,3), 95(24,2), 94(18,1), 92(18,2), 45(18,1), 44(100), 43(93,9).

Le spectre de masse (fig. 43) ne montre pas de pic moléculaire, mais par contre permet de déceler, par la présence des fragments à m/z 107-109, 138 et 165, correspondant à la même unité S, que les depsides déjà rencontrés (A_4 et A_7). L'unité A, qui comporte deux fonctions carboxyliques, se fragmente rapidement pour donner: m/z 180, 166 et 152 (voir schéma 13). A noter encore la présence de m/z 44 (CO_2^+) très intense indiquant la décarboxylation des deux fonctions acides de l'unité A.

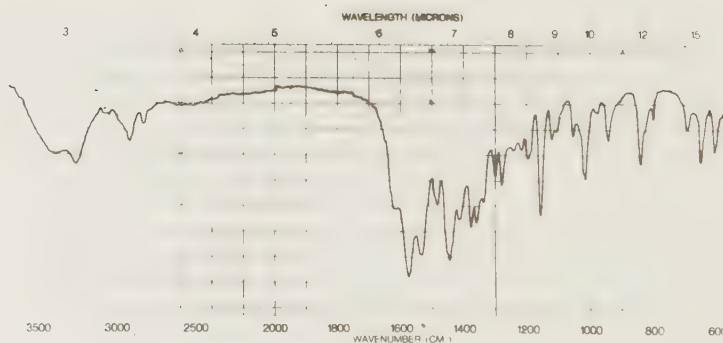
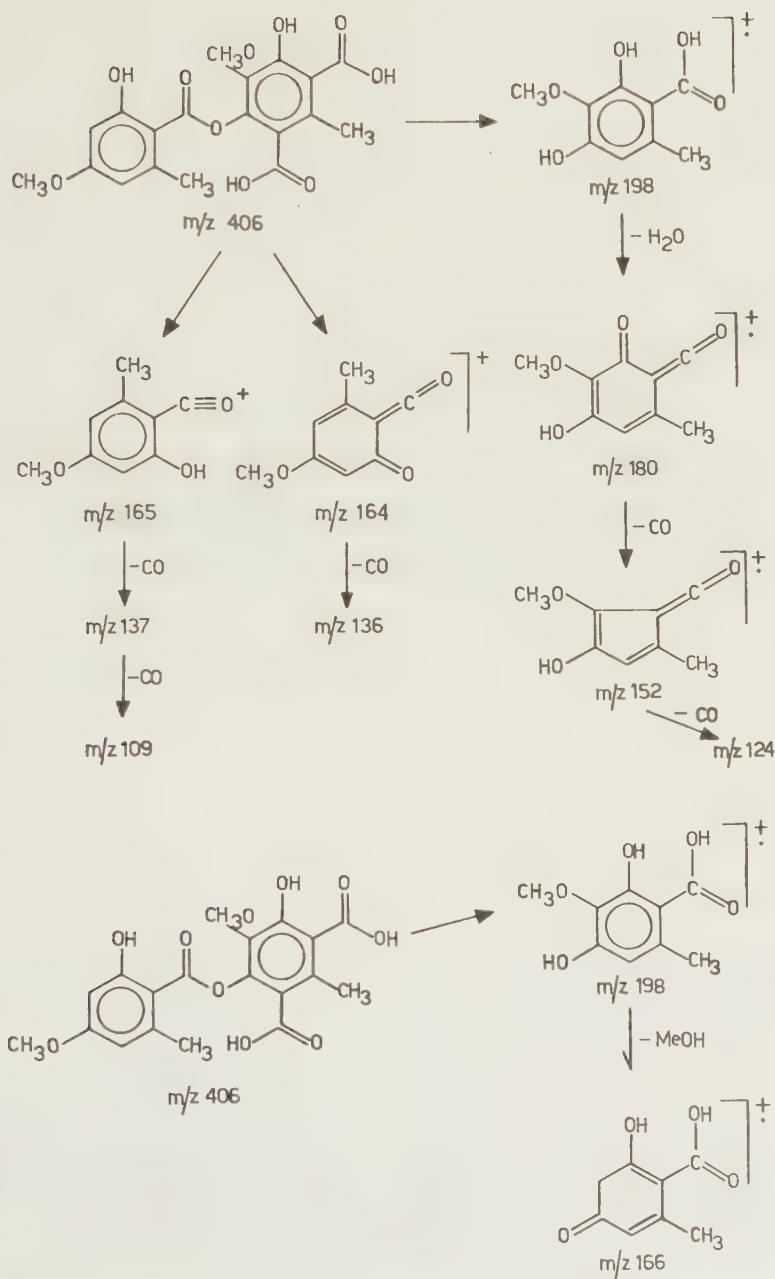


Fig. 40: Spectre IR de A_8



SCHEMA 13: Fragmentation de A_8

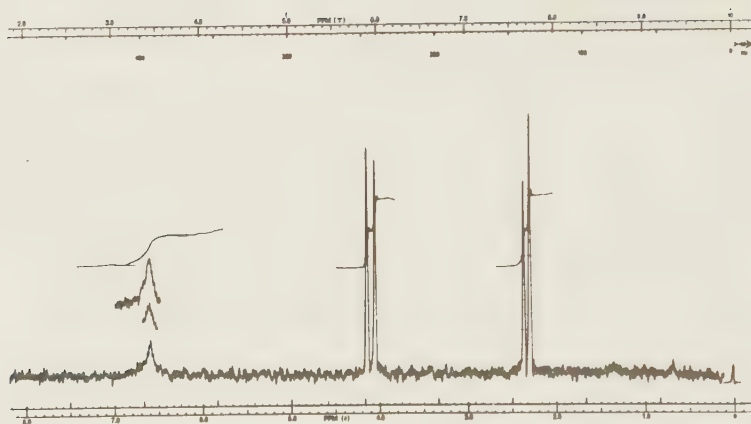


Fig. 41a: Spectre ^1H -RMN de A_8

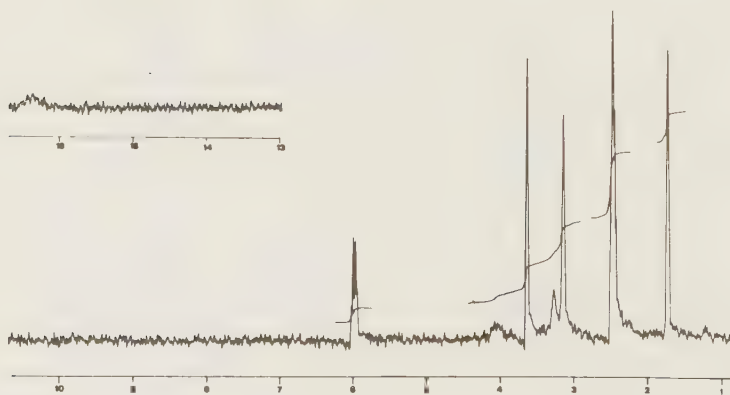


Fig. 41b: Spectre ^1H -RMN de A_8

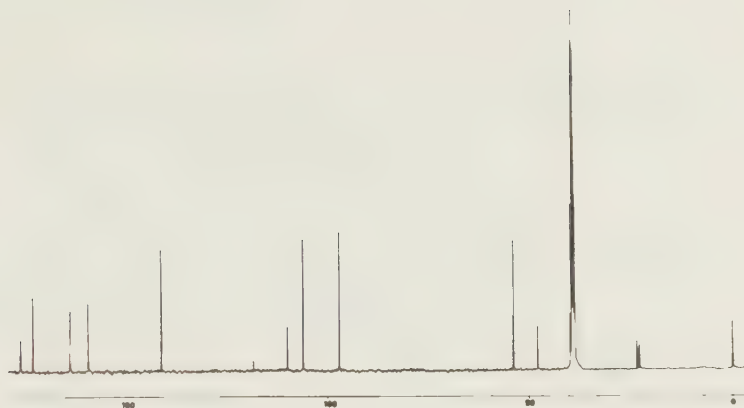


Fig. 42: Spectre ^{13}C -RMN de A_8

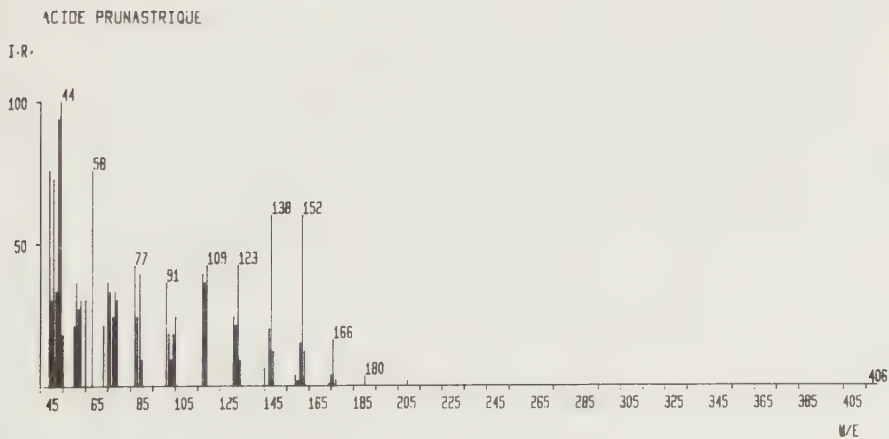
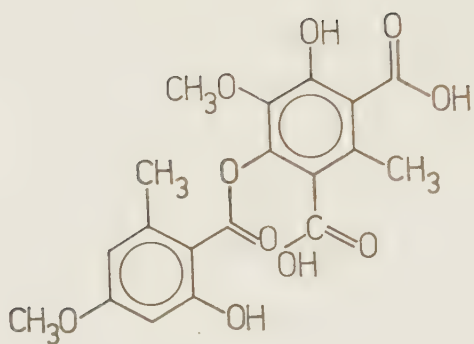


Fig. 43: Spectre de masse de A_8



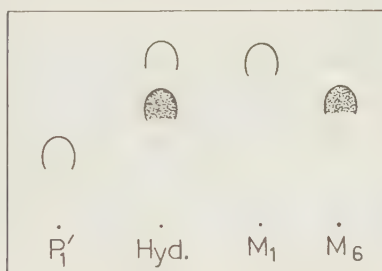
Acide prunastrique

5.9. Identification de P_1'

P_1' est recristallisé dans méthanol/eau d'abord, puis dans le cyclohexane. 50 mg (F. 125-128°) ont été isolés. Le test des depsides s'est révélé positif [23].

UV (MeOH): $\lambda_{\max}$: 306, 267-271, 230 nm

L'hydrolyse de P_1' avec KOH méthanolique donne deux spots, que l'on identifie comme étant l'orsellinate de méthyle et le β -orcine-carboxylate de méthyle.



Support: Silicagel
Solvant: Toluène-AcOH 20:4
Révélateur: UV 254 nm

Fig. 44: Chromatogramme de P_1' hydrolysé

Le spectre IR présente les absorptions caractéristiques des depsides 3350-3400 (ν -OH) et 1660 (ν -CO) cm^{-1} . (Fig. 45).

Le spectre ^1H -RMN de P_1' nous montre 3 groupes méthyles sur un cycle aromatique dont un, plus blindé à 2,2 ppm, tel que nous l'avons déjà observé dans le cas de l'évernine pour la position 3'. Les autres signaux nous confirment la présence de 3 protons aromatiques et d'une fonction carbométhoxyle. (Voir fig. 46).

^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz): 2,2 (s, 3H, CH_3 -C(3')); 2,5 (s, 3H, CH_3 -C(6')); 2,6 (s, 2H, CH_3 -C(6)); 3,95 (s, 3H, COOCH_3); 6,35 (s, 2H, H-Ar); 6,5 (s, 1H, H-Ar).

Le spectre ^{13}C -RMN de P'_1 (fig. 47 et tableau 4) nous permet de constater, premièrement, la différence de déplacement (1 ppm) du C(3), si nous avons en C(4) un hydroxyle à la place d'un méthoxyle (même remarque pour l'acide lécanorique) et, deuxièmement, comme pour l'évernine, la valeur du méthyle en C(3'), 11 ppm plus faible que celle normale d'un méthyle aromatique. Ceci découlant du très grand empêchement stérique.

Toutes ces données ainsi que les fragments observés en spectrographie de masse m/z 196, 164, 151, nous permettent d'établir la structure de P'_1 comme étant le méthyl-3' lécanorate de méthyle. (Voir synthèse, chap. 8).

SM (m/z , I%): 346 (M^+ 16), 197(9), 196(74), 168(2), 166(9), 165(32,5), 164(98), 163(19), 152(32,5), 151(100), 150(9), 137(28), 136(93), 135(37), 121(9), 109(14), 108(23), 107(37), 91(12), 83(19), 79(46,5), 77(45), 69(28), 55(32,5), 53(45), 43(32,5). m^* 137,22(196+164), 112,78(164+136), 85,76(136+108). (Voir fig. 48).

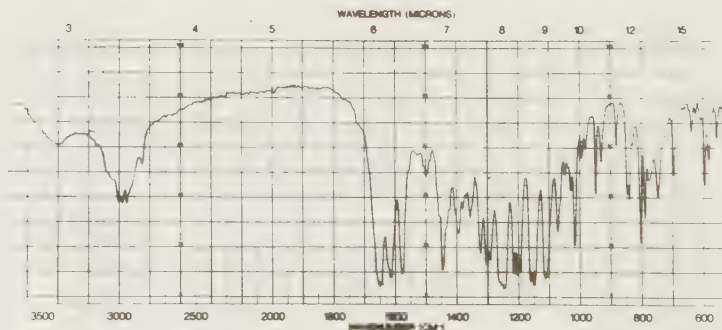


Fig. 45: Spectre IR de P'_1

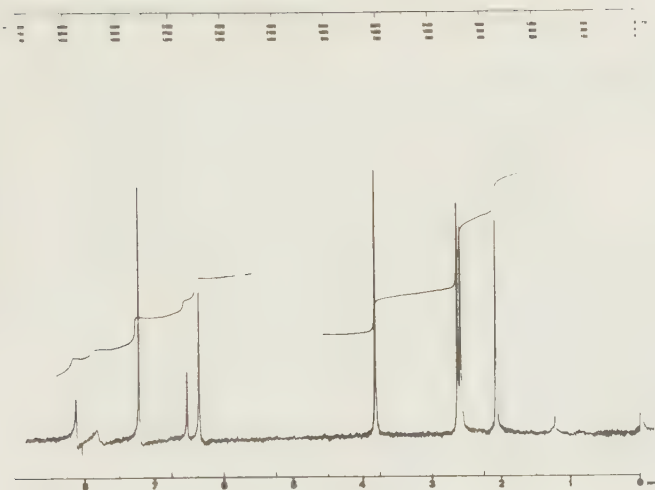


Fig. 46: Spectre ^1H -RMN de P_1'

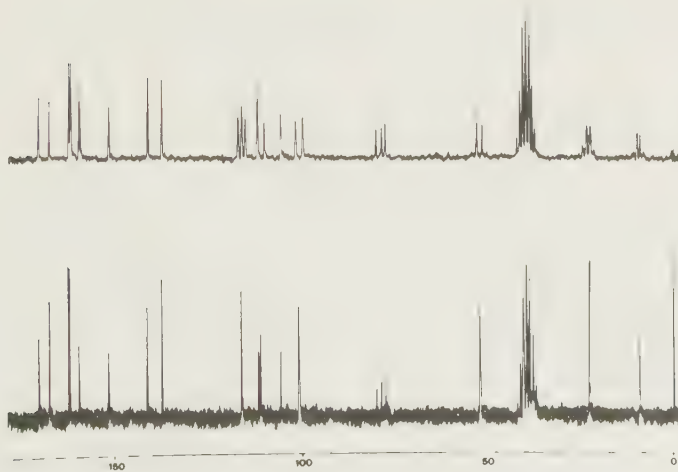


Fig. 47: Spectre ^{13}C -RMN de P_1'

METHYL-3' LECANORATE DE METHYLE

I.R.

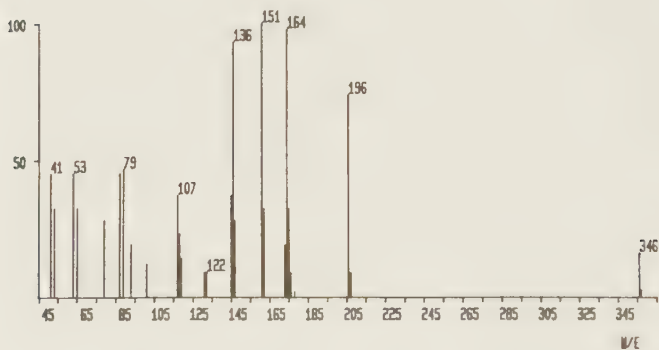
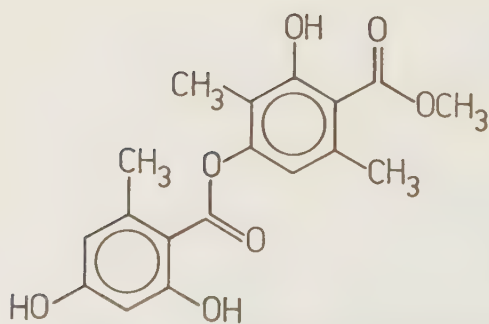


Fig. 48: Spectre de masse de P₁'



5.10. Identification de P'_2

P'_2 est recristallisé dans hexane/acétone, isolé 200 mg. F. 140-145°, réaction positive au test des depsides avec le chlorure ferrique [23].

UV (MeOH): $\lambda_{\max}$: 298, 258, 227 nm.

Le spectre UV, par rapport aux autres depsides, montre un déplacement hypsochrome de toutes les bandes en particulier celle à 258 nm, que l'on trouve normalement à 265-270 nm, (A_4 , A_6 et P'_1). Ceci laisse supposer une conjugaison plus grande dans P'_2 que pour les depsides déjà rencontrés.

L'hydrolyse avec KOH 2N fait apparaître en CCM deux spots, alors que la chromatographie gazeuse des produits monoarylés sous forme de dérivés triméthylsilylés (réactif bis(triméthylsilyl)-N,O-trifluoracétamide) donne trois pics. Analysés par CG-SM, nous les identifions comme étant:

1. O-TMSi-2 éverninate de TMSi
2. di-O-TMSi-2,4 orsellinate de TMSi, et
3. O-TMSi-4 isoéverninate de TMSi

Relevons que par CG, nous avons pu différencier 1 de 3.

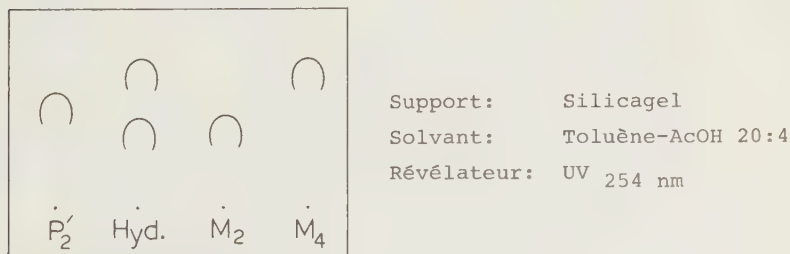


Fig. 49: Chromatogramme de P'_2 hydrolysé

Le spectre IR de P₂' présente des absorptions plus faibles, (3400 et 1640 cm⁻¹) que celles déjà observées (3500 et 1650 cm⁻¹) pour les bandes caractéristiques des depsides (voir fig. 50). Ceci est toujours dû à la très grande conjugaison.

En ¹H-RMN (voir fig. 51), nous remarquons que trois groupes méthyles ont le même déplacement, 2,5 ppm, et que six protons aromatiques donnent deux signaux 6,30 et 6,32 ppm.

Nous attribuons ce fait à une molécule très symétrique, phénomène que nous observons également en ¹³C-RMN, puisque plusieurs valeurs se recoupent (voir fig.52 et tableau 4). Relevons que pour le spectre ¹³C-RMN, les temps de relaxation sont très longs, et les signaux correspondants très faibles.

¹H-RMN (DMSO (D6), 360 MHz): 2,5(s,9H,CH₃-C(6), CH₃-C(6'), CH₃-C(6'')); 3,74(s,6H,CH₃O-C(4), CH₃O-C(2'')); 6,30, 6,32 (2d,Δν=7,2Hz AB, J=2 Hz,6H,H-C(3), H-C(5), H-C(5'), H-C(5'')); 12,03(s,1H,OH-Ar).

Ainsi, vu l'hydrolyse et le spectre ¹H-RMN, nous pouvons dire qu'il s'agit d'un tridepside: l'acide O-diméthyl-4,2" gyrophorique dont la conjugaison, plus importante que chez un depside normal, se traduit par des modifications au niveau du spectre UV, IR, et ¹³C-RMN sur les valeurs du déplacement chimique des atomes de carbone assurant la liaison depsidique C(7) et C(7'), et du déplacement de tous les carbones des cycles S et Z par rapport à l'acide évernique (voir tableau 3).

La fragmentation en spectrographie de masse nous montre comme précédemment, la stabilité des ions formés par rapport au pic moléculaire (fig. 53).

SM (m/z, I%): 182(75), 165(42), 164(100), 150(15), 138(90), 136(89), 124(57), 123(42), 122(21), 121(73), 109(72), 107(73), 95(63), 79(42), 77(58), 69(50), 67(53), 65(57), 51(71), 44(73), 43(45).

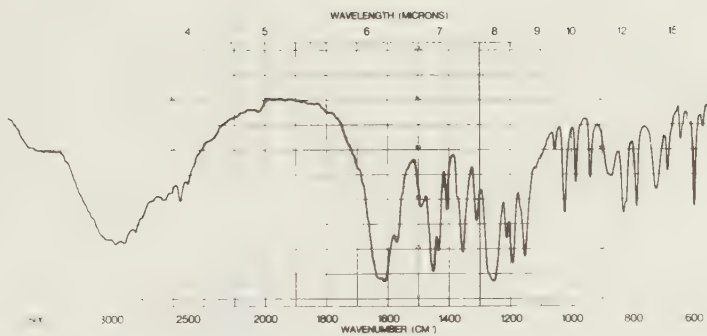


Fig. 50 : Spectre IR de P'₂

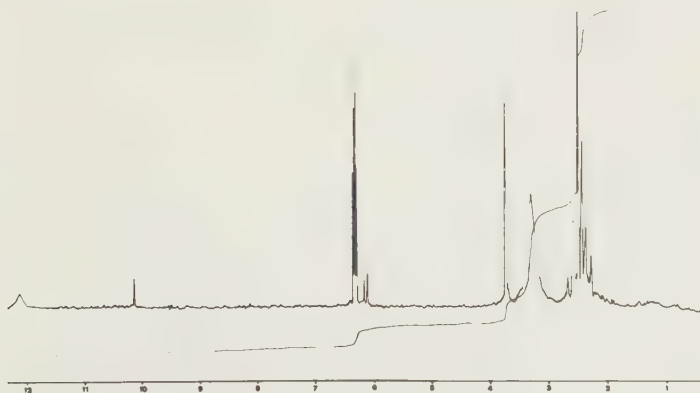


Fig. 51 : Spectre ¹H-RMN de P'₂

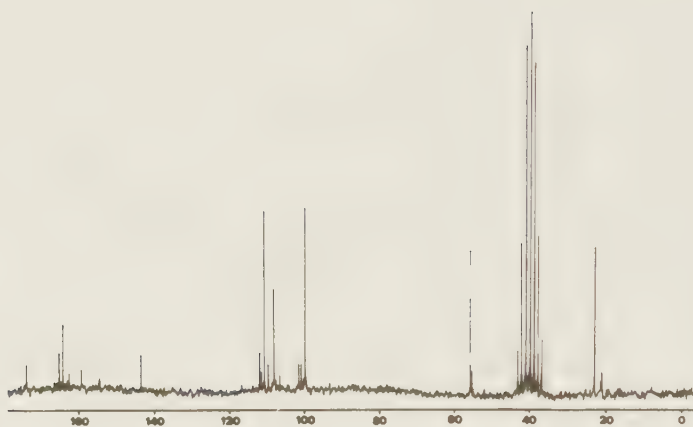


Fig. 52: Spectre ^{13}C -RMN de P'_2

ACIDE O-DIMETHYL-4,2'' GYROPHORIQUE
I.R.

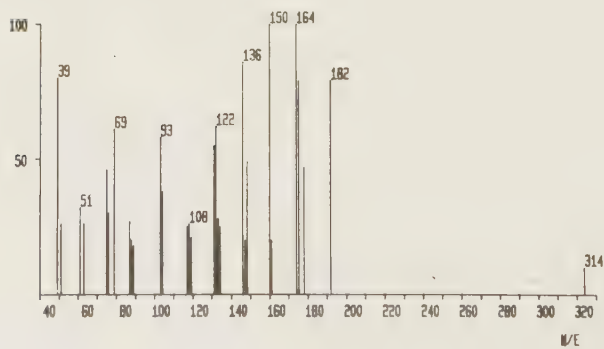
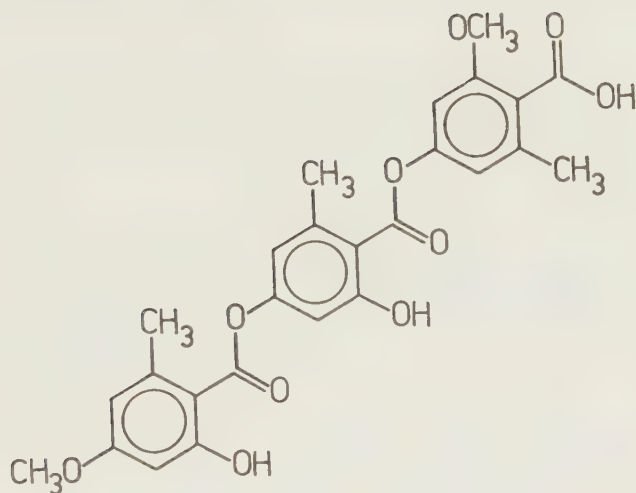


Fig. 53: Spectre de masse de P'_2



Acide O-diméthyl-4,2'' gyrophorique

5.11. Identification de P'_3

P'_3 est isolé en faible quantité, 30 mg, et recristallisé dans l'hexane, et donne un résultat positif au test des depsides, F. 159°.

UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ 305, 267-270, 230 nm

L'hydrolyse avec KOH méthanolique donne deux spots, le β -orcin-carboxylate de méthyle et le sparassol.

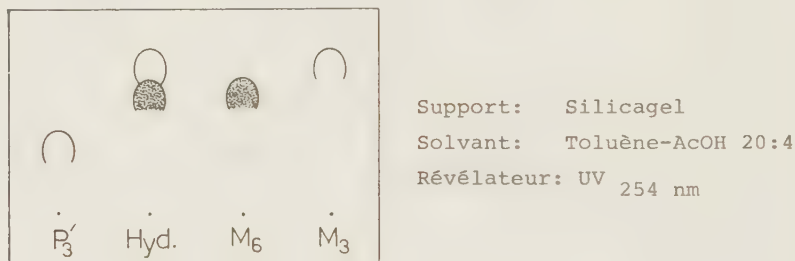


Fig. 54: Chromatogramme de P'_3 hydrolysé

Le spectre IR de P'_3 ressemble à tous ceux vus précédemment (fig. 55).

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ (fig. 56) confirme les résultats de l'hydrolyse, et fait apparaître un groupe méthyle aromatique, fortement blindé, comme nous l'avons déjà rencontré dans P'_1 et A_4 .

Ceci nous permet de déterminer sa position en 3' sur le cycle S, ainsi que la présence d'un substituant acide en 1' sur le même cycle. La valeur de 2,05 par rapport à celles de 2,13 pour A_4 et 2,2 pour P'_1 , depsides ayant un ester en 1', se justifie ainsi:

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 60 MHz): 2,2 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(3')$); 2,5 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6')$); 2,6 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$); 3,95 (s, 3H, COOCH_3); 6,35 (s, 2H, H-Ar); 6,5 (s, 1H, H-Ar).

Le spectre $^{13}\text{C-RMN}$ de P'_3 (fig. 57 et tableau 3) est très semblable à A_4 , et ne nécessite pas de commentaires particuliers,

à part le déplacement du méthyle 9,11 ppm déjà signalé pour A_4 et P'_1 .

Ainsi, la structure de P'_3 est celle de l'acide méthyl-3' évernique, structure qui sera confirmée par synthèse (chap. 8).

Le spectre de masse donne des fragments semblables à A_4 (fig. 58).

SM (m/z , I%): 347(14), 346(M^+ , 63), 183(6), 182(37), 167(11), 166(46), 165(100), 164(68,5), 150(6), 149(17), 138(12), 137(11), 136(54), 122(6), 121(11), 109(11), 108(11), 107(11,5), 95(12), 79(11), 77(14), 69(6), 44(11), 43(23). m^* : 147,78 (182+165), 112,78 (164+136).

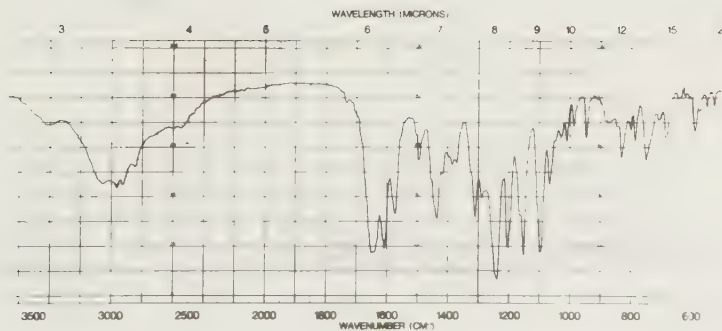


Fig. 55: Spectre IR de P'_3

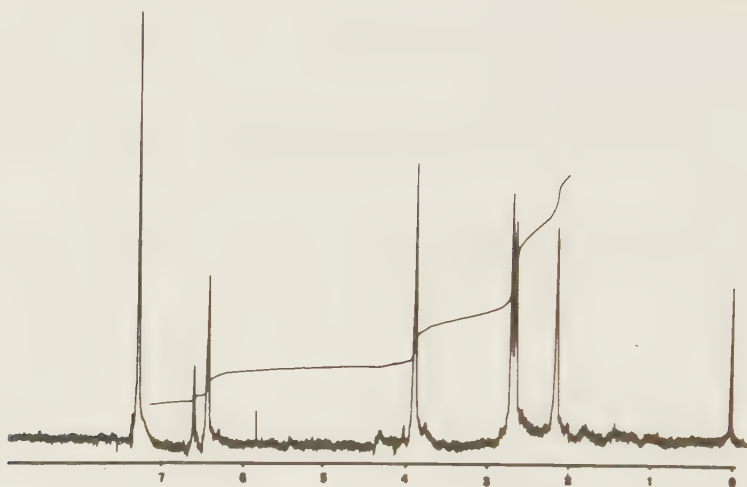


Fig. 56 : Spectre ^1H -RMN de P'_3

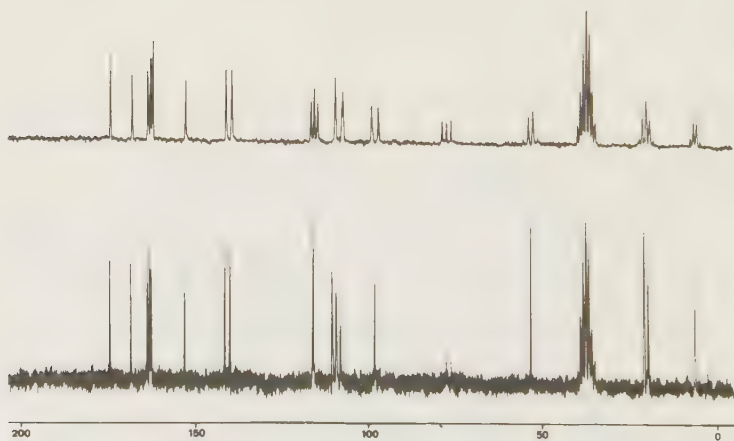


Fig. 57 : Spectre ^{13}C -RMN de P'_3

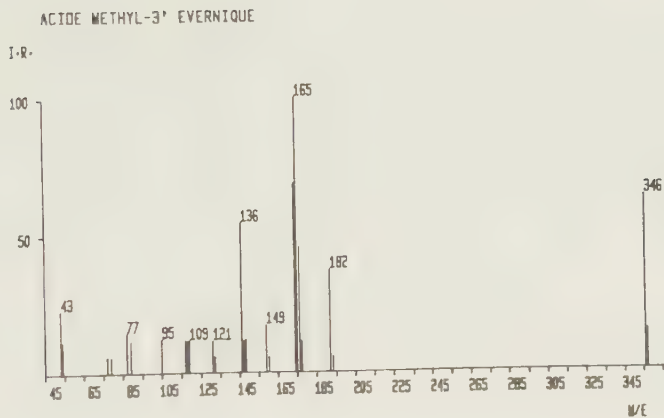
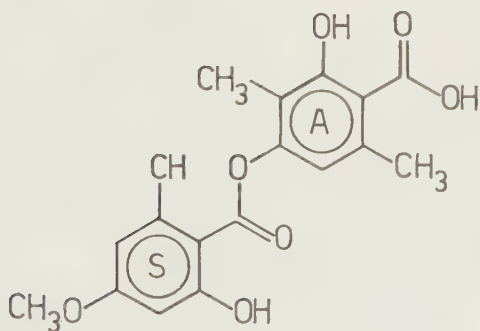


Fig. 58: Spectre de masse de P'₃



Acide méthyl-3' évernique

Tableau 4. Déplacements chimiques des atomes de carbone depsidiques¹⁾

	C(1)	C(2)	C(3)	C(4)	C(5)	C(6)	C(7)
D ₁	108,25	159,58	98,99	162,23	109,91	139,85	166,44
A ₆	105,53	162,21	100,76	162,69	111,78	141,65	167,87
A ₇	107,54	160,48	100,30	161,57	110,00	140,29	166,89
P' ₁	108,02	162,14	98,98	162,92	110,30	140,93	167,39
P' ₂	106,93	161,19	98,68	162,90	109,51	142,29	163,88
P' ₃	109,91	160,21	99,18	162,63	109,91	140,40	167,29

	C(1')	C(2')	C(3')	C(4')	C(5')	C(6')	C(7')
D ₁	115,50	152,30	107,17	159,58	114,54	139,79	
A ₆	116,19	151,97	111,02	159,93	116,91	137,89	
A ₇	115,44	152,26	107,19	160,48	114,54	139,82	
P' ₁	115,87	152,14	109,24	161,66	115,87	139,29	
P' ₂	110,31	153,00	105,35	161,19	110,31	142,29	162,90
P' ₃	123,07	151,32	103,50	156,66	108,65	136,13	

	C(1'')	C(2'')	C(3'')	C(4'')	C(5'')	C(6'')
P' ₂	110,79	158,03	99,7	158,03	108,48	139,00

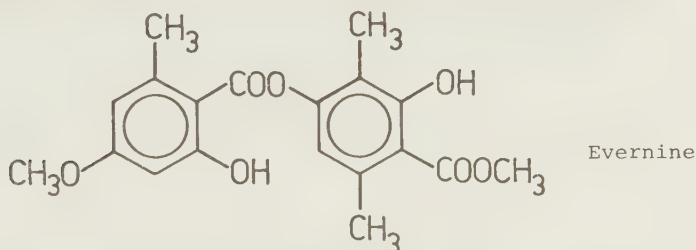
Déplacements chimiques des substituants¹⁾

	CH ₃ -(C(6)	C(3')	C(6')	C(6''))	OCH ₃ -(C(4)	C(2')	C(2''))	COOCH ₃	COOH
D ₁	20,76		20,90		54,95				170,33
A ₆	22,46	9,23	22,76					52,14	
A ₇	20,87		21,15						170,35
P' ₁	22,27	9,11	23,30		55,18				173,47
P' ₂	22,72		22,89	22,72	54,94		54,94		172,50
P' ₃	18,69		21,31		56,07	55,24			168,17

1) Spectres enregistrés à 22,11 MHz dans DMSO-D₆ (en ppm par rapport au TMS)

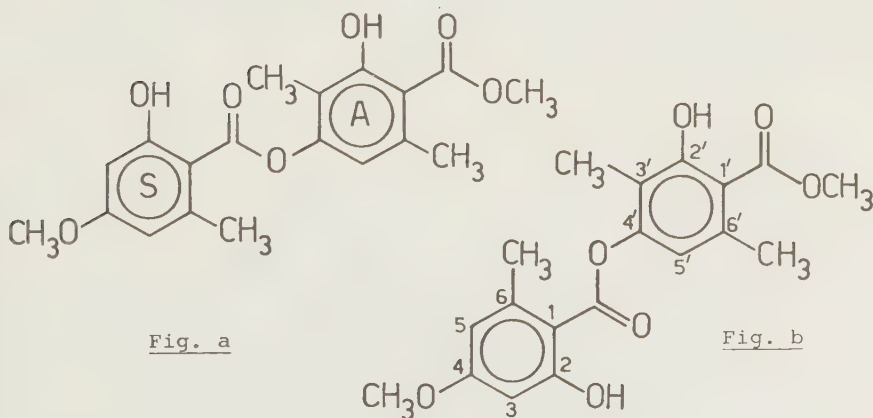
5.12. Stéréochimie des depsides

Sur ce sujet, aucun travail n'a été effectué. Les différents auteurs cités dans ce travail, ainsi que Culberson dans ces deux monographies sur les lichens [14/16] ne donnent pas de détails sur la stéréochimie des depsides décrits. L'écriture admise jusqu'ici pour ces composés est la suivante:



A la suite de notre étude spectroscopique, nous pensons pouvoir établir la stéréochimie de ces molécules en se basant sur des déplacements chimiques en ^1H et ^{13}C -RMN et sur des absorptions IR.

Deux conformations ont retenu notre attention:



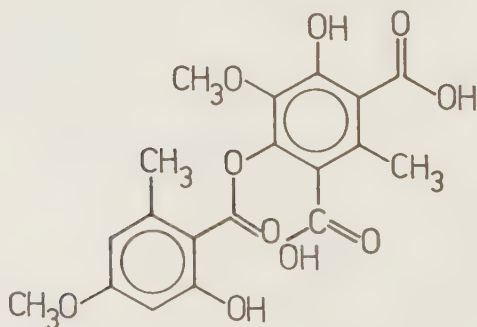
Dans nos publications récentes, nous avons utilisé la représentation a, justifiée par la faible absorption observée en IR pour la fonction ester et par le déplacement en ^1H -RMN du méthyle C(3') 2,13 ppm au lieu de 2,54 ppm. En effet, le spectre IR montre une forte absorption à $1650\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ pour une fonction ester aromatique conjuguée, alors qu'on devrait attendre celle-ci à 1680 cm^{-1} . Ceci nous permet de dire que l'hydroxyle en ortho du carbonyle de l'ester (fig. a) abaisse la valeur de ce dernier par liaison hydrogène intramoléculaire.

Cependant, après avoir trouvé la structure de A_8 (acide prunastrique), nous pensons pouvoir proposer pour tous les depsides la représentation b; ceci pour les raisons suivantes:

Le spectre IR de A_8 présente une absorption de la bande d'ester encore plus faible que celle précédemment observée: $1640\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ au lieu de $1660\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$.

Comme nous pouvons le voir dans la figure c, le carbonyle de l'ester peut former deux ponts hydrogènes avec l'hydroxyle en ortho C(2) et le carbonyle du C(3'). Ceci explique donc l'abaissement de 20 cm^{-1} enregistré en IR pour la fonction carbonyle de l'ester.

Fig. c



Dans le spectre ^1H -RMN de l'évernine (fig. b), nous remarquons que l'hydrogène aromatique en C(5') à 6.58 ppm est déblindé par le carbonyle, puisque la valeur normale se situe à 6,3 - 6,4 ppm (pour C(3) et C(5)). Nous observons le même phénomène pour A_4 , A_6 , P'_1 et P'_2 .

De plus, en ^{13}C -RMN, nous pouvons faire la même considération quant au déplacement du carbone en C(5'). Dans le cas de A_4 (fig. b), ce déplacement est de 116,94 ppm alors que pour C(5) il se situe à 111,88 ppm. De nouveau, les mêmes constatations peuvent être faites pour A_6 , P'_1 et P'_2 .

5.12. Identification de T'₁

Isolé en petite quantité (5 mg), il a été recristallisé dans le méthanol. F. 60°.

Par hydrolyse, nous avons constaté un abaissement de Rf, mais vu les faibles quantités, il ne nous a pas été possible d'isoler les produits.

Le spectre IR (fig. 59) nous montre la présence d'une chaîne aliphatique, d'un ester et des bandes caractéristiques de composés depsidiques.

Le spectre RMN du proton (fig. 61) effectué à 200 MHz confirme la présence d'une chaîne aliphatique importante.

¹H-RMN (D₄, 200 MHz): 0,9 (t, 3H, CH₃-CH₂), 1,0 (s, 6H, (CH₃)₂-C-O), 1,6 (s, nCH₂), 2,5 (s, DmsO + CH₃-Ar), 3,8 (s, OCH₃-Ar + H₂O), 5,9 (s, H-Ar).

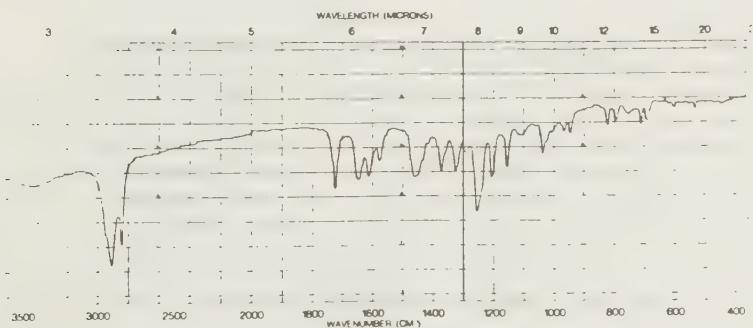
Le spectre de masse (fig. 62) nous montre la présence de l'acide éverninique (M₄) dans la partie aromatique de T'₁ et une chaîne aliphatique dont le PM serait de 630 et qui élimine 14 chaque fois. Afin de comparer les IR, nous avons effectué ainsi le spectre IR de l'éverninate d'éthyle, et nous pouvons distinguer les similitudes suivantes: - les bandes de 1650 à 1575 cm⁻¹, 1450, 1320, 1260, 1220-1190, 1150 et 1040-1000 cm⁻¹ (fig. 60).

Le schéma de fragmentation de T'₁ est caractéristique d'un composé monoarylique, avec le fragment de l'acide éverninique à M⁺ 182, le double transfert d'hydrogène dans les esters, conduisant à m/z: 183. La perte de 18 (H₂O par effet ortho, donnant le m/z: 164, qui par élimination de CO (28) nous conduit à m/z: 136 (voir schéma 14).

Par contre, au niveau du reste aliphatique, nous ne pouvons pas donner sa structure. Nous pensons qu'il s'agit d'une chaîne comportant un carbone tertiaire substitué par deux méthyles (RMN: 1ppm) et probablement par une longue chaîne linéaire saturée. Si on avait un méthylène en α de la fonction ester, il devrait apparaître autour de 4 ppm. La fragmentation en spectrographie de masse confirme aussi ces hypothèses, par la double transposition d'hydrogène, conduisant à m/z : 183, et l'allure du spectre dans la zone des hautes masses, qui est typique d'un hydrocarbure linéaire saturé. Comme nous n'avons pas assez de substances, nous ne pouvons pas préciser davantage la structure de T_1' .

Du point de vue biogénétique, une telle structure est possible si on envisage une estérification entre l'acide éverninique et un alcool gras.

SM (m/z , I%): 630(M^+ , 1), 603(4), 602(10), 588(2), 575(11), 574(11), 560(3), 547(6), 546(14), 518(9), 490(1), 218(1), 184(1), 183(52), 182(37), 181(6), 166(15), 165(77), 164(100), 149(12), 136(36), 125(6), 121(6), 111(13), 109(7), 97(32), 87(19), 83(43), 82(16), 81(10), 71(43), 69(16), 65(13), 57(71), 55(65), 43(68), 41(56). m^* : 148,77(183+165), 147,78(182+164), 112,78(164+136).



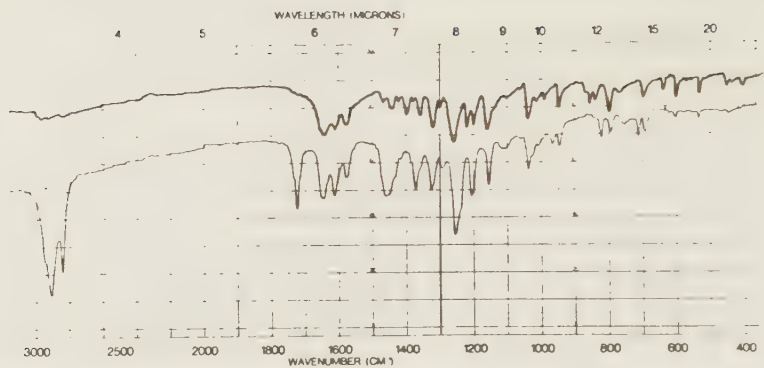


Fig. 60: Spectre IR de l'acide éverninique + T₁'

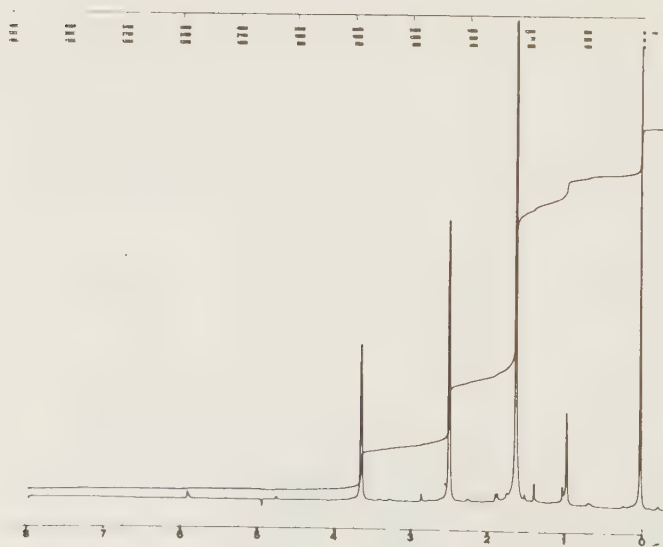
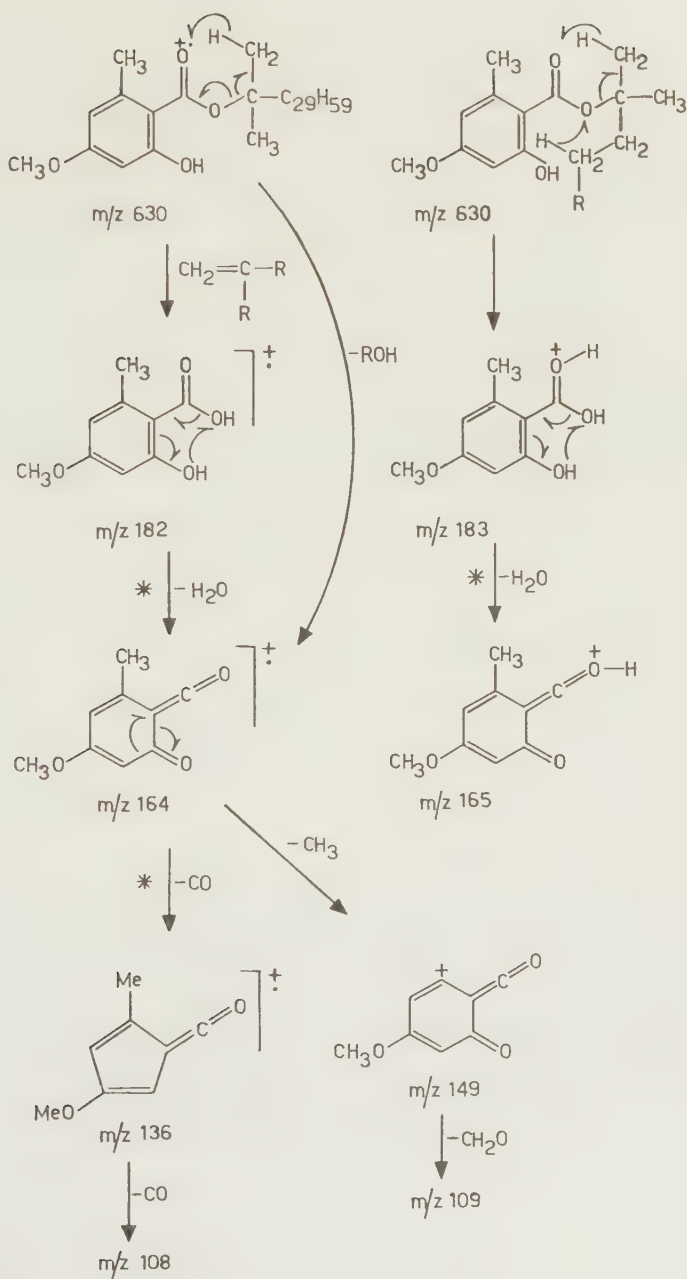


Fig. 61: Spectre ¹H-RMN de T₁'



SCHEMA 14: Fragmentation de T_1'

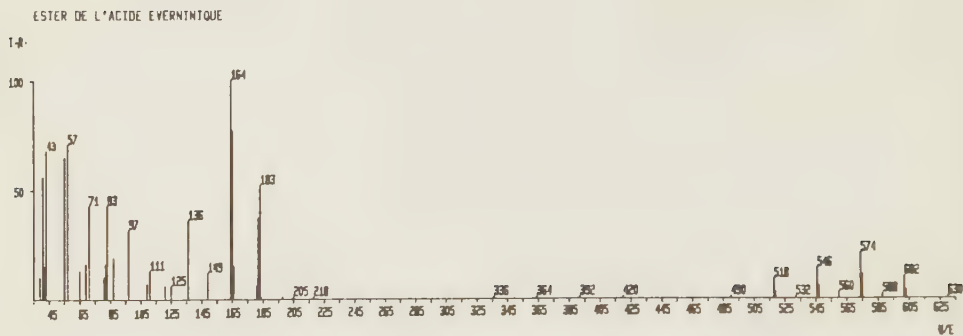
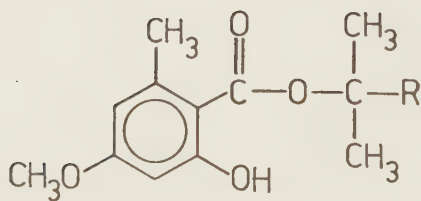


Fig. 62: Spectre de masse de T₁'



Ester de l'acide évernique

5.14. Identification de T'₂

Isolé en très petite quantité (5 mg), il a été recristallisé dans le méthanol. F. 80°.

Par hydrolyse, nous avons constaté un abaissement de Rf. Cependant, vu les faibles quantités des fragments résultants, il ne nous a pas été possible de les identifier.

Le spectre IR (fig. 63) nous montre la présence d'hydroxyles, de méthyles et méthylènes, d'un ester, d'une fonction aldéhyde ainsi que celle d'un cycle aromatique.

Le spectre RMN du proton (fig. 65) effectué à 200 MHz confirme la présence d'une chaîne aliphatique importante, fixée vraisemblablement sur un ester aromatique ($\text{COOCH}_2\text{-R}$ à 4,1 ppm). Le noyau aromatique est pentasubstitué, (deux hydroxyles, une fonction aldéhyde, un groupe méthyle et la fonction ester).

^1H -RMN (C_6D_6 + DMSO, 200 MHz): 0,9(m, 6H, $2 \times \text{CH}_3\text{-R}$), 1,33(s, 1H, CH_2 et CH aliphatique), 2,3(s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 3,6(s, OH + H_2O), 4,1(t, 2H, $\text{COOCH}_2\text{-CH}_2$), 6,28(s, 2H, H-Ar), 8,25(s, 1H, CHO-Ar), 8,6(s, 2H, OH-Ar).

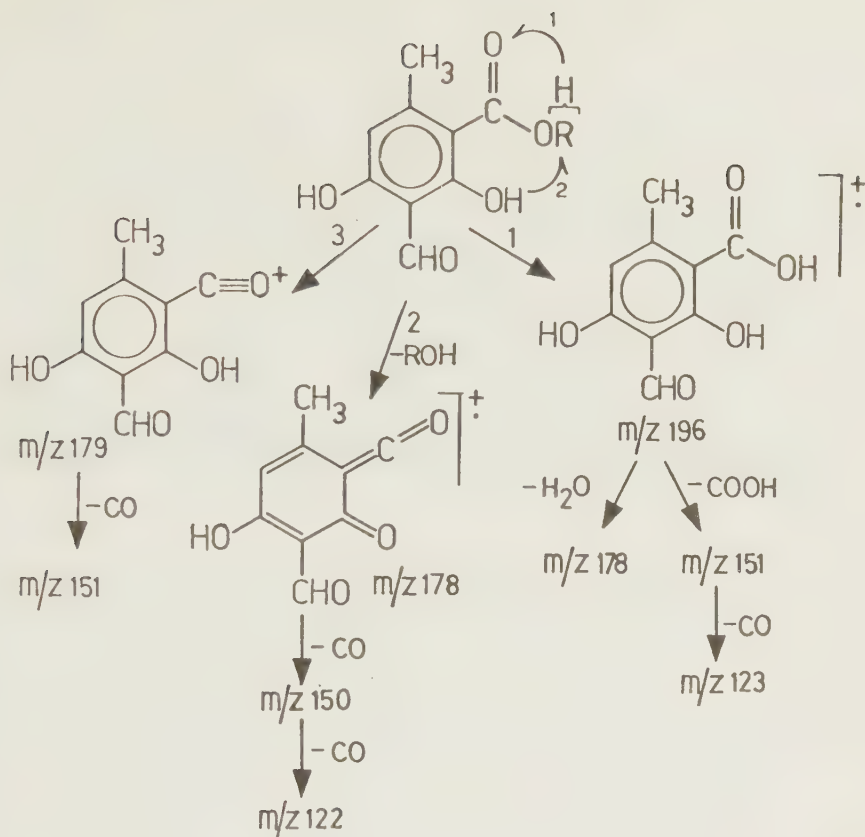
Le spectre de masse (fig. 66) malgré l'absence du pic moléculaire, nous apporte quelques précisions importantes. Il indique notamment que la partie aromatique de T'₂ est constituée d'un ester de l'acide haematomique, ceci est confirmé par le spectre infrarouge (fig. 64), lequel, excepté les bandes dues à la chaîne aliphatique, montre de grandes similitudes avec celui de T'₂. (Bandes communes: 1650, 1570, 1430-1420, 1395, 1260, 1180, 1120, 710-690 cm^{-1}).

SM (m/z , I%): 616(1,5), 602(0,5), 598(0,5), 589(1,5), 588(6), 574(1), 570(1), 561(1), 560(1,5), 560(6), 546(1,25), 542(1,25), 533(6), 532(11), 518(1,25), 514(1,5), 504(3), 420(1,25), 393(1,5), 392(1,5), 364(1,5), 336(1,5), 301(3,5), 241(1,5), 197(4), 196(19), 180(10), 179(100), 178(30), 168(5), 164(6), 151(8), 150(50), 136(4), 125(3), 123(4), 122(2), 109(7), 107(6), 97(19), 95(11), 85(12), 71(23), 70(10), 69(40), 57(70), 43(90), 41(40). m^* : 580,52(616+598), 552,5(588+570), 524,5(560+542), 596,6(532+514), 161,65(196+178), 126,4(178+150).

Le spectre de masse de T'_2 nous fait penser à un ester de l'acide haematomique, car nous observons le fragment correspondant m/z : 196 et les éliminations successives de ce dernier. (Voir schéma 15).

De plus, la présence de plusieurs métastables correspondant à la perte de 18 (H_2O), nous laisse penser que notre composé contient quelques groupes hydroxyles sur la chaîne aliphatique de l'alcool. Le spectre 1H -RMN ne montre cependant pas de protons en α du groupe hydroxyle, mais par contre le signal à 3,6 ppm, que nous avons justement attribué à des hydroxyles, augmente sensiblement d'intensité par la seule ouverture du tube RMN ou par une filtration. Ceci indique que T'_2 est fortement hygroscopique. Pour identifier la chaîne, il faudrait pouvoir séparer l'ester et étudier la chaîne séparément. Malheureusement, le peu de substance disponible après les nombreux essais que nous avons effectués, nous a empêché d'effectuer ce travail.

D'une manière générale, nous pouvons dire cependant que T'_2 , comme T'_1 , a sans doute la même origine: l'estérification d'un acide haematomique avec un alcool aliphatique à longue chaîne.



SCHEMA 14: Fragmentation de T'_2

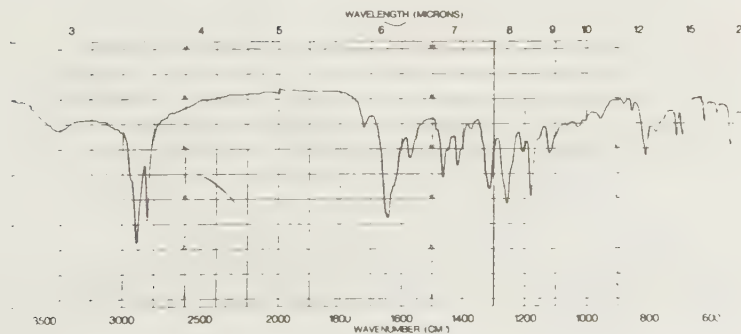


Fig. 63

Spectre IR de T'_2

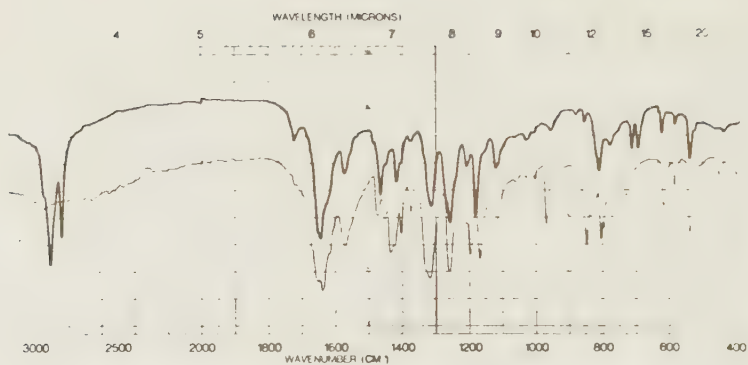


Fig. 64: Spectre IR de l'haematome d'éthyle + T_2'

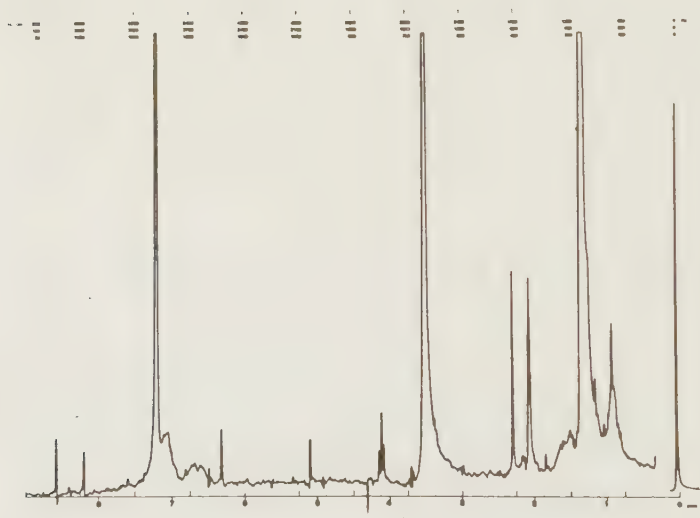


Fig. 65: Spectre 1H - RMN de T_2'

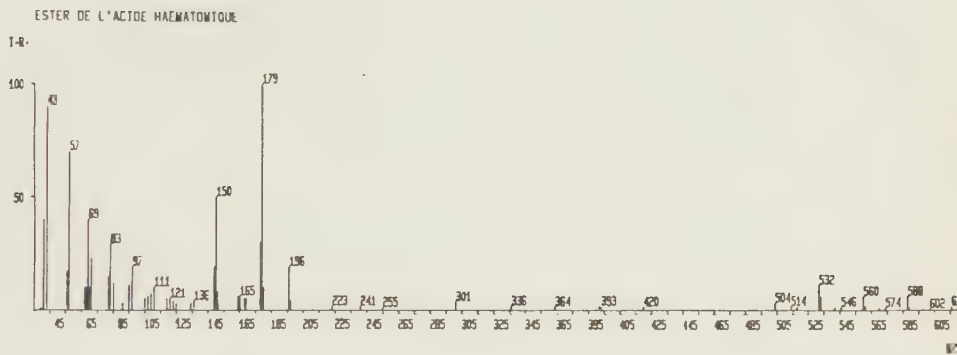
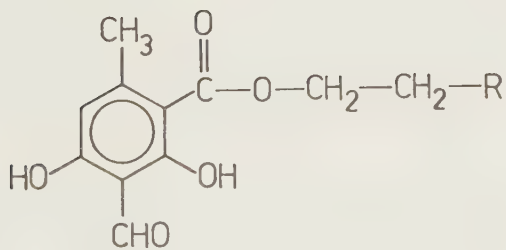


Fig. 66: Spectre de masse de T'₂



ester de l'acide haematomique

5.15. Identification de T'₃

Solide blanc, F. 136-140°, recristallisé dans MeOH.

UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ 225, 243-252 nm.

Le spectre infrarouge révélant la présence d'un hydroxyle, nous avons acétylé notre produit. F. 130°.

IR (KBr) cm^{-1} : 3400m, 2960ff, 2850m, 1720ff, 1670-1620m, 1480-1450m, 1380f, 1245f, 690m.

On constate la présence de méthyles et méthylènes, du carbonyle de l'acétate et de doubles liaisons.

Le spectre ^1H -RMN du produit acétylé (fig. 67) nous montre un groupe de méthyles (6), deux autres méthyles sur une double liaison, le méthyle de l'acétyle et un proton oléfinique. Au vu de l'IR et de la RMN, nous pensons à un triterpène. Par comparaison avec la littérature [26] nous attribuons à T'₃ la structure du Lanostérol.

^1H -RMN (C_6D_6 , 200 MHz): 0,75(s,3H,3H-C(13)), 0,80(s,3H-C(20)), 0,82(s,3H,3H-C(14)), 0,85(s,3H,3H-C(18)), 0,9(s,3H,3H-C(19)), 1,0(s,3H,3H-C(10)), 1,5-1,6(6H,3H-C(26) et 3H-C(27)), 1,25-1,76(m,23H), 2,1(s,3H,COCH₃), 4,65(m,1H,1H-C(3)), 5,75(m,1H, H-C(24)).

Ces attributions ont pu être faites grâce à la littérature sur le lanostane [24].

Le spectre de masse nous a permis de confirmer la structure du lanostérol (fig. 68).

SM de T₃' acétylé (m/z, I%): 469(35), 468(M⁺, 100), 454(26), 453(52), 434(16,6), 408(8), 394(10), 393(21), 383(8), 351(3), 323(8), 315(8), 301(22), 241(8), 191(80), 189(9), 164(18), 109(26), 107(15), 97(26), 83(26), 81(26), 71(72), 69(52), 57(81), 55(72), 43(81), 41(72).

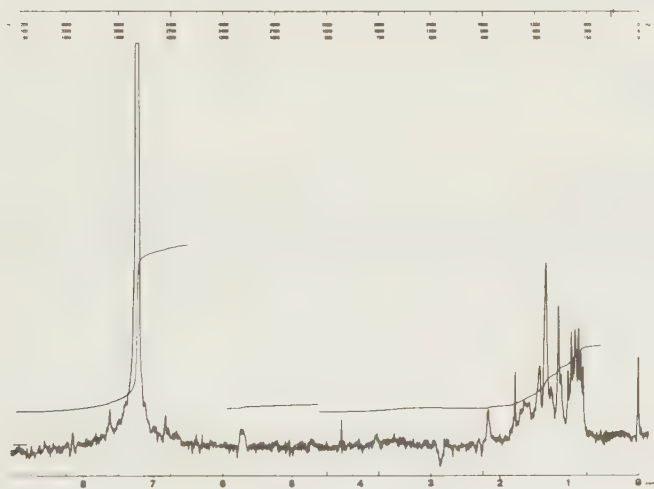


Fig. 67: Spectre ¹H-RMN de T₃' acétylé

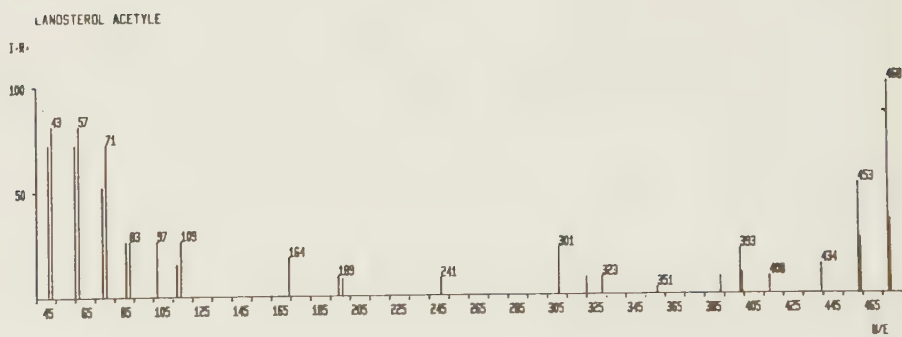
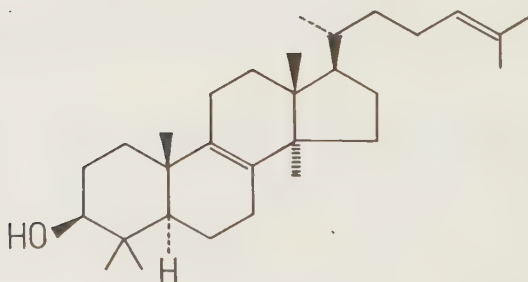


Fig. 68: Spectre de masse de T₃' acétylé



5.16. Identification de T'₄

Isolé également en petite quantité (10 mg). F. 210°.

Son spectre IR nous montre une bande hydroxyle et une forte absorption au niveau des méthyles et méthylènes. L'aspect général du spectre est celui d'un triterpène.

IR (KBr) cm^{-1} : 3400m, 2920ff, 2860ff, 1620f, 1460m, 1380m, 1140-1110m.

Le spectre RMN du proton (fig. 69) nous indique 8 groupes méthyles, dont un fixé sur une insaturation, probablement un vinyle terminal. Ceci est confirmé par la présence de deux multiplets distincts à 4,55 et 4,68 ppm. Nous pensons à un triterpène, dont le dernier cycle est contracté et sur lequel se trouve fixé une chaîne isopropényle. Par comparaison avec le spectre de la moretenone A₃, et selon la littérature [25], nous pouvons confirmer la position d'attache de la chaîne en C(19) pour T'₄. Dans ce cas, la rotation est moins libre qu'en C(21) pour A₃. Ceci a pour effet que les deux H vinyliques apparaissent sous forme de deux multiplets au lieu d'un singulet comme c'était le cas pour A₃, où les protons oléfiniques, grâce à la rotation libre, sont isochrones.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 0,73(s,3H), 0,85(s,3H), 0,9(s,3H), 0,925(s,3H), 0,98(s,3H), 1,05(s,3H), 1,1(s,3H), 1,6(s,3H,3H-C(30)), 1,3-1,7(23H), 3,65(t,1H,H-C(3)), 4,55(m,1H,H-C(29)), 4,68(m,1H,H-C(29)).

L'étude du spectre de masse (fig. 70) nous permet de conclure que T_4' correspond au Lupéol.

SM (m/z , I%): 426 (M^+14), 411(4), 383(0,5), 218(30), 207(10), 206(1), 205(1), 204(7), 203(6), 189(20), 149(17), 135(11), 125(17), 121(11), 111(29), 109(23), 107(11), 97(58), 83(86), 69(88), 57(87), 55(88), 43(100).

Pour la fragmentation, voir le schéma 11).

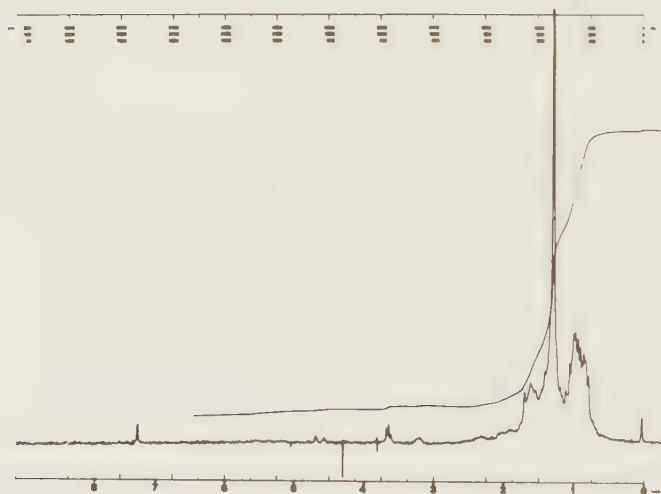


Fig. 69: Spectre ^1H -RMN de T_4'

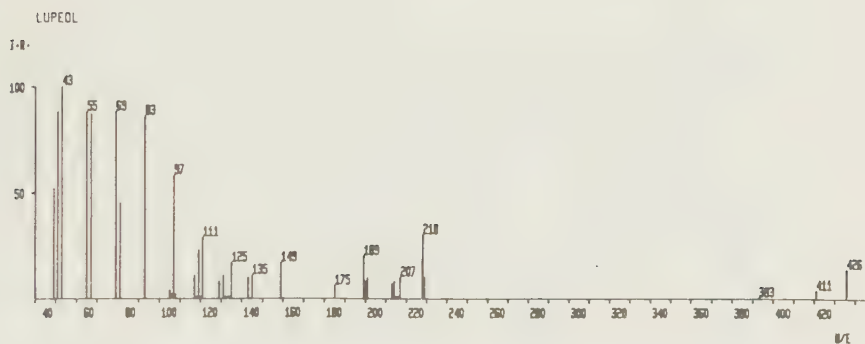
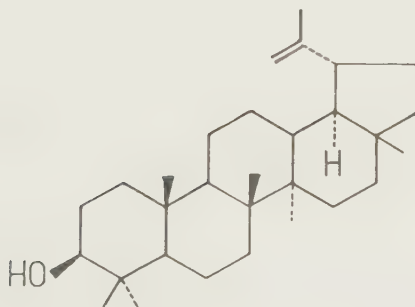


Fig. 70: Spectre de masse de T'₄



Lupéol

5.17. Identification de T'₅

Il s'agit d'un solide blanc qui a été purifié par sublimation (55 mg). F. 262°.

Le spectre IR nous montre deux fonctions: hydroxyle et acide à 3500-3400 (-OH) et 1700 cm⁻¹ (-CO), ainsi qu'une forte absorption au niveau des méthyles et méthylènes. Nous pensons à un acide triterpénique du type ursolique ou oléanolique. Par méthylation au diazométhane (CH₂N₂), nous obtenons un solide jaunâtre, F. 110°, recristallisé dans le toluène.

IR (KBr) cm⁻¹ de T'₅ non méthylé: 3500-3400m, 2910ff, 2850ff, 1700ff, 1450m, 1400m, 1270-1250m, 710m.

Le spectre RMN du proton de T'5 méthylé et acétylé nous indique : sept méthyles, un méthoxyle et un acétoxyle, ainsi qu'un triplet à 4,4 ppm et un signal large à 5,2 pour un CH vinylique. (fig. 71).

¹H-RMN (CDCl₃, 60 MHz) : 0,75-1,0(m, 21H, 7 groupes méthyles), 2,0(s, 3H, R-COOCH₃), 3,55(s, 3H, ((3)-OCH₃), 4,4 1t, 1H, H-C(3)), 5,2(6-s, 1H, H-C (12)).

Compte tenu du spectre ¹H-RMN, du spectre IR et des données physiques par comparaison avec la littérature [27], nous trouvons qu'il s'agit de l'acide ursolique.

Le spectre de masse (fig. 72) confirme ces données.

SM (m/z, I%): 456(M⁺ 4), 438(6), 423(3), 410(3), 393(3,2), 249(20), 248(100), 207(16), 204(8), 203(60), 202(4), 190(8), 189(20), 175(4), 173(3), 150(3), 149(16), 133(32), 121(12), 119(16), 95(12), 81(16), 69(20), 67(8), 59(20), 57(25), 55(20), 44(16), 43(2).

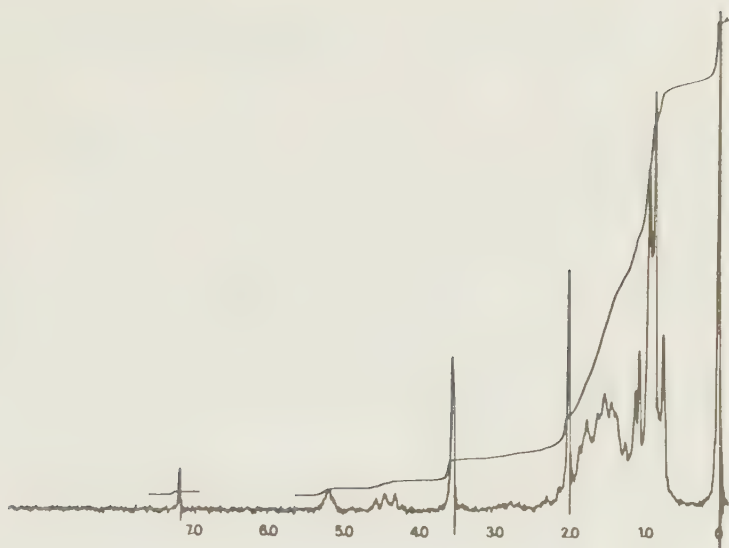


Fig. 71: Spectre ^1H -RMN de T'_5

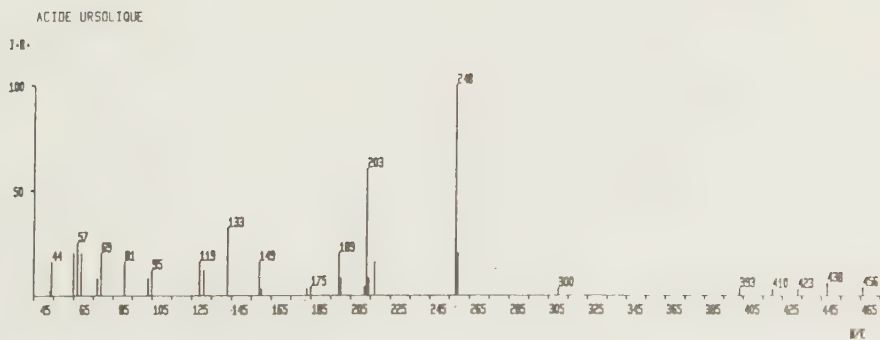
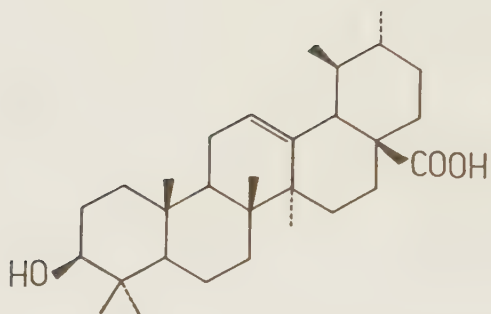


Fig. 72: Spectre de masse de T'_5



Acide ursolique

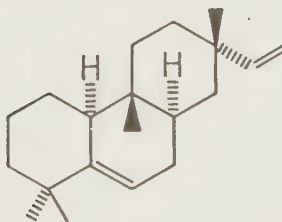
5.17. Identification de T'₆

T'₆ se présente sous forme d'une huile légèrement jaunâtre. $[\alpha]_D = 43,0^\circ$ dans le CHCl_3 . Son spectre de masse, et la comparaison avec la littérature [29] nous montre qu'il s'agit d'un diterpène, le Rimuène. Pour confirmer ce résultat, nous comparons aussi avec la littérature [28], les spectres IR et ¹H-RMN.

IR (KBr) cm^{-1} : 3080f, 2940-2825ff, 1640f, 1450m, 1370m, 1130f, 990f, 910f.

¹H-RMN (CDCl_3 , 60 MHz): 0,75(s,3H, CH_3), 0,8(s,6H,2x CH_3), 0,92(s,3H, CH_3), 1,2 à 2(m,14H, CH_2), 3,9 à 4,5(dx d, $\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2$), 4,65(m, H-C(14)), 4,9 à 5,3(m, $\text{HC}=\text{CH}_2$ terminal).

SM (m/z, I%): 273(12,5), 272(M^+ , 53,3), 257(100), 229(5), 215(5), 187(14), 175(20,8), 161(31,6), 159(10), 136(30), 121(37), 93(33), 91(32), 81(50), 80(37), 79(30), 69(28), 67(30), 50(55), 41(80).



6. Identification des produits isolés par chromatographie gaz-liquide.

6.1. Introduction

Tous les composés que nous décrirons par la suite ont été identifiés par chromatographie gaz-liquide, couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Cette technique nous permet d'identifier un grand nombre de composés dans un mélange complexe sans devoir isoler chaque composé à l'état pur; de plus, elle est d'une grande sensibilité. Des quantités, de l'ordre du nanogramme, peuvent en effet encore être identifiées.

Cependant, la GC/MS ne donne pas toujours les résultats attendus, car sur l'unique base du spectre de masse, il est bien souvent difficile d'établir avec certitude la structure du composé. Il est donc nécessaire de disposer d'autres moyens tels que le spectre de masse de référence du composé pur, les temps de rétention relatif et le témoin pur pour le dopage.

Dans le cadre de notre travail, nous avons analysé, par cette méthode (GC/MS), quelques fractions obtenues par chromatographie liquide-liquide, qui semblaient ne révéler que 4 ou 5 produits avec nos systèmes de révélation conventionnels, mais qui une fois introduites en phase gazeuse présentaient pas moins d'une vingtaine de pics.

6.2. Analyse en GC/SM de P₁

Cette fraction, pauvre en composés depsidiques, provient d'une colonne de polyamide, solvant (MeOH/H₂O) (voir chapitre 4.4, figure 13). En chromatographie gazeuse sur une colonne polaire, nous avons obtenu la séparation suivante:

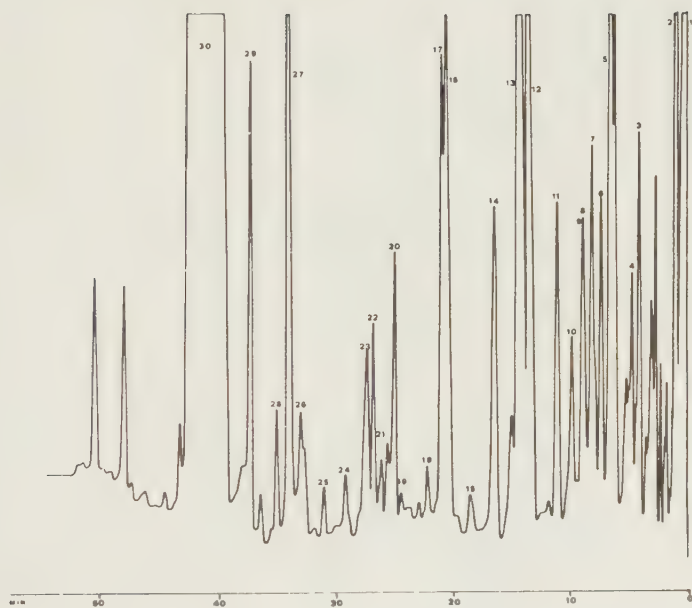


Fig. 73: Chromatogramme de la fraction P_1 obtenu sur une colonne 5% de Carbowax 20M sur Chromosorb G (1=2m), $t^{\circ}=30-230$ $2^{\circ}\text{C}/\text{mn.}$

Tableau 5 : Composition chimique de la fraction P₁

Pic	M ⁺	Substance	TR
1	142	décane	1,00
2	156	undécane	1,31
3	152	triméthyl-1,3,3 norbornanone	3,05
4	132	α-diméthyl styrène	3,35
5	152	méthyl-2 décaline	4,30
6	132	diméthyl-3,5 styrène	4,65
7	138	éther monométhyllique de l'orcinol	5,08
8	136	linalool	5,50
9	166	méthyl-3 undécyne-5	5,50
10	150	myrtenal	5,95
11	134	isobutylbenzène	6,55
12	150	o-tertbutylphenol	7,75
13	136	terpinolène	8,20
14	134	p-méthylacétophénone	9,30
15	134	diéthyl-1,4 benzène	10,35
16	152	cis-carveol	11,35
17	150	p. cymène-8 ol.	11,55
18	152	fraction P ₁ /18	12,17
19	196	tetradécène-1	13,31
20	94	phénol	13,60
21	152	fraction P ₁ /21	14,15
22	182	diméthyl-3,5 décène-3 one-2	14,50
23	212	méthyl-trans-dodécénoate-9	14,80
24	228	fraction P ₁ /24	15,18
25	210	bisabolane	16,55
26	210	p-ditolyléthane-1,2	17,50
27	196	β-orcine-carboxylate de méthyle	18,00
28	210	β-humulane	18,55
29	138	orcinol	19,26
30	199	N,N-diméthyl-p-toluène-sulphonamide	21,51

6.2.1. Spectres de masse des composés nouvellement
identifiés dans P₁. m/z (I%) références [29]

- 3: 152(M⁺ 18,9), 151(2,4), 141(1,5), 134(1,5), 123
(2,4), 119(6,3), 117(1,5), 109(7,9), 105(2,3), 95
(3,1), 91(7,9), 82(11), 81(100), 80(15,7), 79(7,9),
77(6,1), 69(84,8), 57(7,9), 55(8,1), 43(6,3), 41
(28,3), 39(12,6).
- 4: 133(13,6), 132(M⁺ 100), 131(18,1), 117(93,1), 116
(13,6), 115(34,8), 105(11,8), 92(27,2), 91(46,3),
85(13,6), 81(20), 77(16,3), 71(20), 68(22,7), 65
(20), 57(37,2), 55(26,3), 43(30,9), 41(33,3). m⁺:
103,7(132→117).
- 5: 153(2,7), 152(M⁺ 21,8), 137(2,7), 111(3,6), 110
(10,9), 109(15,4), 108(21,8), 97(14,5), 95(41,8),
93(9,0), 83(100), 82(14,5), 81(36,3), 77(10,9), 69
(45,4), 67(18,1), 55(49), 53(10,9), 43(14,5), 41
(43,6), 39(18,1).
- 6: 133(24), 132(100), 131(20), 117(84,6), 115(32,6),
105(21,3), 97(28), 95(22,6), 92(26,6), 91(52,6),
83(35,3), 81(20), 77(22), 75(26), 69(38,6), 65(22),
57(20), 55(44), 43(41,3), 41(48), 39(39,3).
- 9: 167(11,7), 166(M⁺ 41,2), 151(35,3), 135(17,6), 123
(20,6), 108(100), 107(29,4), 81(47), 75(35,3), 67
(35,3), 58(11,7), 57(20,6), 55(47), 43(58,8), 41
(76,4), 39(41,1).
- 10: 150(M⁺ 15,8), 136(15,7), 135(26,3), 121(24,1), 119
(15,7), 117(15,9), 109(13,8), 108(52,6), 107(94,7),
106(47,4), 105(42,1), 95(24,7), 93(27,7), 91(42,1),

79(100), 77(52,6), 71(26,3), 69(26,3), 67(26,3),
57(26,3), 55(31,6), 53(26,3), 43(47,4), 41(63,1).

11: 134(M^+ 45,4), 119(40,9), 109(38,6), 105(18,1), 95
(18,1), 93(31,8), 92(100), 91(86,4), 83(84), 81
(45,4), 79(36,3), 77(31,8), 70(81,8), 69(63,6), 67
(81,8), 57(22,7), 55(86,3), 53(27,2), 43(54,5), 41
(90). m^* : 105,67 (134 $\rightarrow$ 119).

12: 151(7,3), 150(M^+ 98,1), 136(7,3), 135(100), 122
(14,6), 121(9,1), 109(16,5), 108(27,5), 107(99),
105(18,3), 95(23,8), 91(95,4), 82(34,8), 80(47,7),
79(39,4), 77(20,1), 69(14,6), 65(18,3), 63(14,6),
55(27,5), 53(18,3), 43(14,6), 41(40,3), 39(40).
 m^* : 121,5 (150 $\rightarrow$ 135).

13: 137(10,4), 136(89,5), 122(7,4), 121(92,5), 108(7,4),
107(19,4), 105(7,4), 95(28,3), 94(20,8), 93(94),
91(37,3), 82(19,4), 81(85), 79(28,3), 77(17,9), 68
(83,5), 67(74,6), 59(100), 55(28,3), 43(82), 41
(74,6), 39(25,3). m^* : 107,65 (136 $\rightarrow$ 121), 71,47(121 $\rightarrow$
93), 63,59(136 $\rightarrow$ 93).

15: 134(M^+ 41,4), 119(47,1), 108(21), 107(21), 106(18),
93(38,5), 92(28,5), 91(71,4), 85(45,6), 83(38,5),
81(57,1), 79(52,8), 77(38,5), 71(54,2), 69(55), 67
(45,7), 57(72,8), 55(85,7), 43(80), 41(100), 39
(51,4).

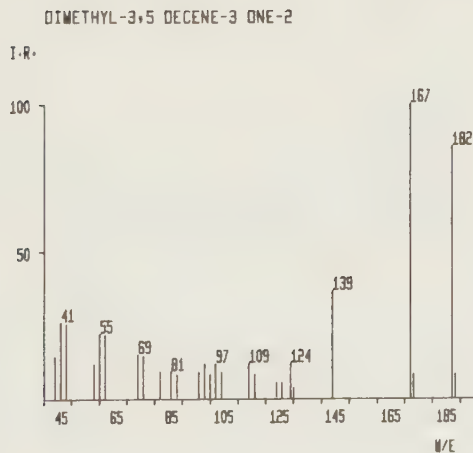
16: 152(M^+ 68,5), 137(9,2), 134(26), 133(9,2), 132(9),
124(11,1), 119(81,4), 117(11,1), 109(100), 108
(14,8), 105(29,6), 95(14,8), 93(29,6), 91(92,5),
84(94,4), 83(29,6), 79(26), 77(29), 71(14,8), 69
(26), 55(35,1), 53(14,8), 43(40,7), 41(42,5), 39
(26).

- 17: 150(M^+ 9,8), 136(4,7), 135(73), 133(15,8), 132(100), 131(19), 119(4,7), 118(7,9), 117(87,3), 116(11,1), 115(30,1), 105(7,9), 92(22,2), 91(33,3), 77(11,1), 71(7,9), 69(7,9), 65(17,4), 63(11,1), 57(12,2), 55(11,1), 51(12), 43(87,3), 41(15,8), 39(17,4), 28(80). m^* : 121,5(150→135), 103,7(132→117).
- 18: 152(M^+ 10), 135(20), 134(16,3), 119(15,4), 117(12,7), 115(10), 111(14,5), 110(10), 109(31,8), 107(11,8), 105(15,4), 98(20), 97(27,2), 96(12,7), 95(20), 93(23,6), 92(14,5), 91(40), 84(20), 83(55,4), 81(20), 77(10), 71(42,2), 70(20), 69(70,1), 67(27,2), 57(50), 56(26,3), 55(66,3), 51(20), 44(26,3), 43(100), 42(11,8), 41(79), 39(41,8).
- 19: 196(M^+ 10), 181(15), 169(7,5), 147(17,5), 146(10), 141(5,4), 134(20), 125(15), 119(15), 117(22,5), 115(17,5), 111(15), 109(20), 105(15), 97(27,5), 95(17,5), 91(32,5), 85(100), 83(31), 81(31), 77(20), 71(40), 69(40), 65(20), 57(52,5), 55(45), 51(20), 43(67,5), 41(55), 39(32,5).
- 21: 153(5), 152(M^+ 11,7), 141(10), 137(6,6), 135(8,3), 129(8,3), 125(8,3), 119(11,6), 117(5), 111(8,3), 109(16,6), 108(15), 107(11,6), 105(8,3), 101(5), 97(16,6), 95(16,7), 91(18,3), 86(8,3), 85(100), 84(8,3), 83(21,6), 81(23,3), 79(11,6), 78(10), 77(11,6), 71(26,6), 69(28), 67(26), 57(35), 55(37), 53(11,6), 51(8,3), 43(83,3), 42(15), 41(82), 39(21,6).
- 22: 183(8,2), 182(M^+ 85,4), 168(8,2), 167(100), 139(36,3), 125(3,6), 124(11,8), 121(5,4), 119(5,4), 111(8,2), 109(11,8), 99(9), 97(11,8), 95(8,2), 93(11,8), 91(9), 83(8,2), 81(9,2), 77(9,2), 71(14,5), 69(15), 57(21,8), 55(22), 53(11,8), 43(25,4), 41(26), 39(14,5).

- 23: 212(M^+ 18,9), 197(18,1), 181(17,2), 167(16,3),
158(16,1), 155(28,4), 143(39,6), 141(16), 125
(16,1), 119(21,5), 117(40,5), 95(30,1), 91(30,1),
87(62), 83(57,7), 81(31,8), 79(16), 77(27,5), 74
(9,4), 71(32,7), 69(66,3), 67(39,6), 57(47,4), 55
(93,1), 43(99), 41(100).
- 24: 228(M^+ 4), 211(5), 185(10), 169(9,2), 157(8), 153
(12), 141(12), 136(14), 129(12), 124(14), 111(16),
109(15), 105(16), 97(22), 95(28), 94(27), 91(22),
85(26), 84(8), 83(27), 82(8,2), 81(30), 77(15),
75(36), 71(100), 69(42), 67(20), 57(50), 56(8), 55
(54), 43(60), 41(70), 39(26).
- 25: 210(M^+ 11,6), 196(4,6), 195(25,6), 165(4,6), 152
(3), 141(5), 133(16,3), 123(4,6), 119(16), 111
(16,3), 109(18,6), 105(23,2), 97(100), 95(23,2),
91(22), 85(21), 83(27,9), 81(26), 79(23,2), 71(30,2),
69(41,8), 68(58,1), 57(48,8), 55(46,5), 51(14), 43
(51,1), 41(62,8), 39(27,9).
- 26: 211(5,5), 210(M^+ 37), 195(1,8), 180(1,5), 178(1,8),
119(5,5), 118(11,1), 111(5,5), 106(20,3), 105(100),
104(5,5), 91(7,4), 79(13), 78(5,5), 77(18,5), 71
(5), 69(5), 65(5,5), 57(9,2), 55(8,7), 43(9,2), 41
(9,2), 39(8,7).
- 28: 211(7,7), 210(M^+ 26,9), 183(7,7), 141(11,5), 135
(13,4), 121(13,4), 119(19,2), 118(21,1), 111(11,5),
108(11,5), 106(13,4), 105(100), 104(5,7), 97(15,3),
95(26,9), 93(15,3), 91(21,1), 85(15,3), 83(17), 81
(21,1), 79(21,1), 77(28,8), 71(30,7), 69(32,7), 65
(15,3), 57(40,3), 55(40), 53(13,4), 51(19,2), 43
(38,4), 41(37,8), 39(28,8).

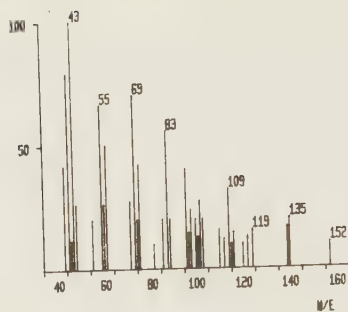
30: 201(13,7), 200(30), 199(M^+ 88,7), 198(16,2), 157
(16), 156(17), 155(71,2), 135(7,5), 134(18,7), 93
(8,7), 92(65), 91(100), 90(13,7), 89(27,5), 77
(8,75), 65(57,5), 63(26,2), 51(18,8), 44(75), 43
(58,7), 42(27,5), 41(41,2), 39(63,7). m^* 120,72
(199+155), 53,42 (155+91).

6.2.2. Spectres de masse des composés non tabulés dans
la littérature [29]



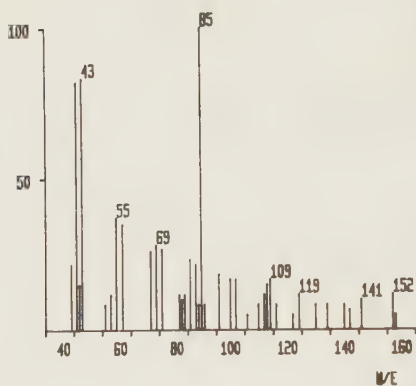
FRACTION P1/18

I.R.



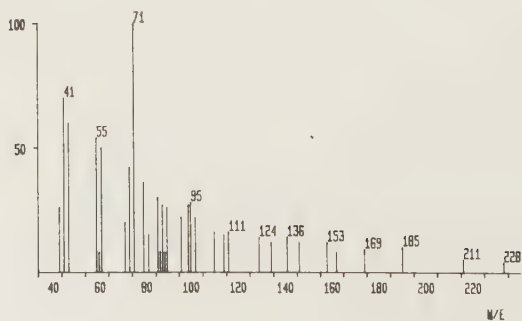
FRACTION P1/21

I.R.

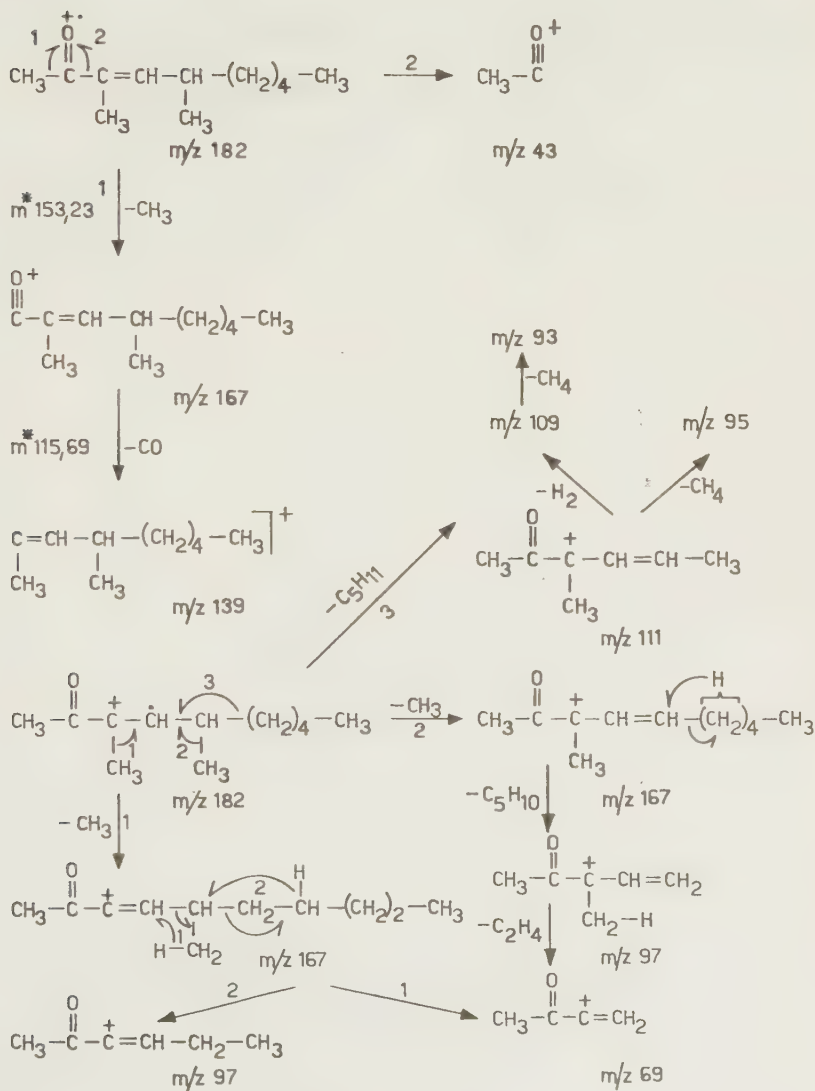


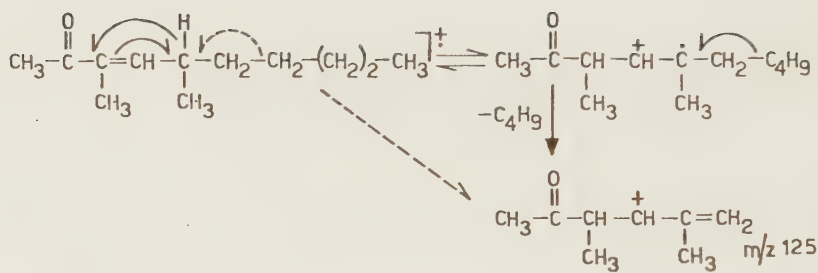
FRACTION P1/24

I.R.



6.2.3. Schéma de fragmentation du diméthyl-3,5 décène-4
one-3.





6.3. Analyse en CG-SM de T₇

Après P₁, nous avons analysé par chromatographie gazeuse une autre fraction, provenant toujours de l'extrait étheré, filtrée sur terre à foulon (voir figure 15, chap. 4.5), mais chromatographiée sur silicagel en éluant au toluène.

L'utilisation d'une phase apolaire (silicone Se 30) permet une bonne séparation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. Sur cette colonne, nous avons ainsi séparé vingt-six produits purs qui ont pu être normalement analysés par spectrophotographie de masse.

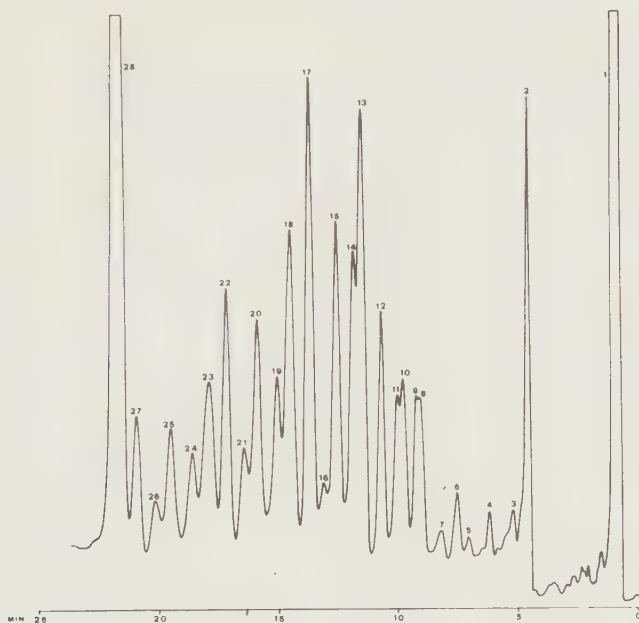


Fig. 74. : Chromatogramme de la fraction T₇ obtenu sur une colonne 10% de silicone SE 30 sur chromosorb W (l=4 m), t⁰=175-290, 2°/mn.

Tableau 6 : Composition chimique de T₇

	M ⁺	Constituants	R.T.
1		acétone	1,28
2		toluène	5,23
3	138	hydroxy-3 méthoxy-5 toluène	5,89
4	152	diméthoxy-3,5 toluène	6,87
5	198	méthyl-2 tridécane	7,76
6	212	diméthyl-4,8 tridécane	8,26
7	226	hexadécane	8,94
8	218	phényl-5 décane	9,85
9	218	phényl-4 décane	9,86
10	218	phényl-3 décane	10,61
11	196	β-orcine-carboxylate de méthyle	10,84
12	218	phényl-2 décane	11,54
13	232	phényl-5 undécane	12,39
14	232	phényl-4 undécane	12,73
15	232	phényl-3 undécane	13,45
16	216	phényl-1 décène-3	13,98
17	232	phényl-2 undécane	14,58
18	246	phényl-5 dodécane	15,49
19	246	phényl-4 dodécane	15,93
20	246	phényl-3 dodécane	16,77
21	230	phényl-5 undécène-3	17,31
22	246	phényl-2 dodécane	18,07
23	260	phényl-5 tridécane	18,78
24	260	phényl-4 tridécane	19,50
25	260	phényl-3 tridécane	20,43
26	244	phényl-5 dodécène-3	21,06
27	260	phényl-2 tridécane	21,88
28	280	cétone aromatique ou ester	22,69

6.3.1. Spectres de masse des composés nouvellement
identifiés dans T7 m/e (I%)

- 5: 198(M^+ 10,2), 154(9,1), 138(8,0), 124(9,0), 97(14,3),
91(10,2), 85(46,9), 83(20,4), 71(73,5), 70(24,5), 69
(18,4), 57(100), 56(24,5), 55(46,9), 43(95,9), 41
(49,6).
- 6: 212(M^+ 5,4), 159(6,4), 147(8,0), 138(10,8), 119(10,8),
105(16,2), 97(18,9), 91(21,6), 85(35,1), 72(24,3), 70
(56,7), 69(29,7), 57(100), 55(59,4), 43(97,3), 41(81).
- 7: 226(M^+ 2,2), 210(2,1), 190(4,3), 183(5,0), 182(3,2),
173(2,2), 159(4,3), 157(4,5), 156(3,2), 147(4,5), 145
(4,5), 141(7,6), 139(7,8), 134(5,4), 133(9,7), 119
(10,9), 117(2,2), 115(2,4), 105(13), 98(10,8), 95(4,5),
94(4,3), 91(15,2), 85(46), 83(17,4), 71(47,8), 70(13),
69(17,4), 65(4,5), 57(98), 56(17,4), 55(39,1), 43(100),
42(10,3), 41(91,3), 39(19,6).
- 8: 218(M^+ 4,5), 175(5,1), 161(2,8), 147(4,8), 133(10),
129(3,4), 119(3,5), 118(2,5), 117(10), 116(3,5), 115
(10,8), 105(14,8), 104(14,1), 103(8,1), 102(2,4), 92
(8,2), 91(100), 79(4,5), 77(11,6), 69(3,7), 65(8,3),
55(11,1), 51(8,3), 43(23), 41(32,4).
- 9: 219(4,9), 218(M^+ 23,5), 175(24,7), 161(16), 147(23,5),
133(47), 119(12,3), 117(16), 115(11), 105(45,7), 104
(28,4), 92(30,9), 91(100), 78(12,3), 77(16), 71(12,3),
69(13,6), 65(13,6), 57(21), 55(27,2), 43(51,9), 41(59,2).
 m^+ : 140,48(218→175), 101,08(175→133), 62,26(133→91).

- 10: 218(M^+ 11), 189(14,3), 164(4,7), 119(44,4), 105(23,8),
104(12,7), 92(15,8), 91(100), 77(11,1), 57(20,6), 55
(22,2), 43(33,3), 41(44,4). m^* 59,43(105→79), 50,57
(218→105).
- 12: 218(M^+ 10,7), 119(3,0), 117(3,1), 106(30), 105(100),
104(13,9), 103(10,7), 92(3,1), 91(40), 79(13,9), 77
(16,9), 57(13,9), 55(15,4), 43(24,6), 41(35,4). m^*
69,58(119→91).
- 13: 233(4,3), 232(M^+ 28,6), 147(3,2), 133(2,1), 119(6,5),
117(7,7), 115(6,5), 106(56), 105(100), 92(6,5), 91
(61,5), 79(26,4), 77(28,6), 71(9,8), 69(6,8), 65(6,5),
57(23), 55(27,5), 43(54,9), 41(59,3). m^* 101,03(105→
103), 59,93(105→79), 56,46(105→77), 47,52(232→105).
- 14: 233(1,4), 232(M^+ 11,9), 190(3), 189(14,9), 175(2,2),
161(2,2), 147(4,5), 134(4,5), 133(37,3), 120(1,4), 119
(7,4), 118(2,9), 117(10,4), 116(2,9), 115(6,9), 106
(2,9), 105(28,3), 104(19,4), 103(7,4), 92(19,4), 91
(100), 85(7,4), 78(6,9), 77(8,9), 71(6,9), 69(6,9),
65(7), 57(22,3), 56(20,9), 43(35,8), 41(43,3), 39(19,4
32(19).
- 15: 233(2,8), 232(M^+ 11,4), 218(1,4), 204(4,2), 203(18,6),
189(1,2), 187(1,4), 173(1,4), 161(1,4), 159(4,2), 147
(4,2), 145(2,8), 141(1,4), 133(7,1), 131(5,7), 120
(11,4), 119(72,9), 118(7,1), 117(24,3), 105(18,5), 104
(20), 103(7,1), 92(22,8), 91(100), 79(7,1), 78(10), 77
(12,8), 69(7,1), 65(10), 57(18,5), 55(21,4), 51(11,1),
43(34,3), 41(38,6), 39(24,3). m^* 106,47(133→119), 69,5
(119→91).

- 16: 216(M^+ 4,5), 164(6,2), 159(4,5), 147(8), 146(8,2), 145(57,1), 143(8), 141(8), 135(13,4), 131(15,2), 130(19,6), 129(27,7), 128(26,8), 127(10,2), 119(15,2), 118(10,8), 117(41,1), 116(13,4), 115(35,1), 106(6,2), 105(27,7), 104(18,5), 103(13,4), 102(4,5), 92(10,2), 91(100), 79(15), 78(14,5), 77(22,3), 69(8,9), 67(10,8), 66(8,9), 65(15,2), 63(6,2), 57(13,4), 55(25), 53(15,2), 51(15,2), 43(44,6), 42(6,2), 41(55,3), 39(27,7).
- 17: 233(4,3), 232(M^+ 28,6), 119(6,5), 117(7,7), 115(6,5), 106(56), 105(100), 92(6,5), 91(61,5), 77(28,6), 69(4,5), 57(23), 55(27,5), 43(54,9), 41(59,3), 39(4,1).
- 18: 247(3,6), 246(M^+ 15,8), 190(3,6), 189(22), 176(1,5), 175(12,1), 162(3,6), 161(15,8), 148(7,3), 147(42,6), 146(3,6), 133(8,5), 131(7,3), 119(15,8), 117(20,7), 115(12,1), 106(8,5), 105(59), 104(48,7), 103(12,1), 92(34), 91(100), 79(7,3), 78(12,1), 77(15,8), 69(7,3), 65(7,3), 57(12,1), 55(24,3), 43(57,3), 41(61). m^* : 75(147 $\rightarrow$ 105), 56,33(147 $\rightarrow$ 91).
- 19: 246(M^+ 10), 231(3), 203(10), 187(3), 173(3), 147(4), 145(3), 133(16,6), 132(3), 131(6,6), 129(3), 119(4), 118(3), 117(16,6), 116(3), 115(10), 105(16,6), 104(10), 103(6,6), 92(6,6), 91(100), 79(4), 77(3), 57(6,6), 43(16,6), 41(17). m^* : 62,26(133 $\rightarrow$ 91).
- 20: 247(1,4), 246(M^+ 10,1), 230(2,9), 219(2,9), 217(17,4), 187(1,4), 173(2,9), 161(2,9), 159(14,5), 147(5,8), 133(7,3), 131(17,4), 119(73,9), 118(11,6), 117(5,8), 115(14,5), 105(52,2), 104(21,7), 103(10,1), 92(23,2), 91(100), 79(4,1), 77(5,8), 65(5,8), 57(18,8), 55(24,6), 43(62,3), 41(72,5). m^* 191,46(246 $\rightarrow$ 217), 69,58(119 $\rightarrow$ 91).

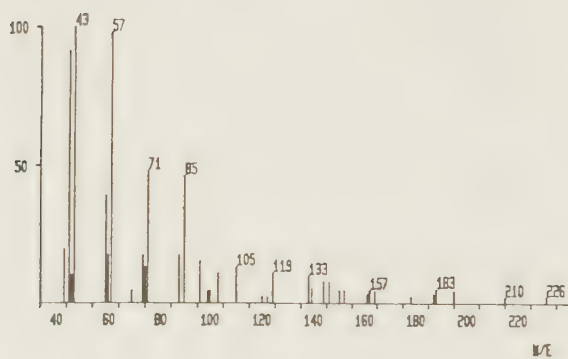
- 21: 230(M^+ 10,7), 154(7,1), 147(7,1), 146(15), 145(100), 144(7,1), 143(10,7), 142(3,5), 141(10,7), 131(17,8), 130(19,6), 129(32,1), 128(27,5), 127(10,7), 119(8,8), 118(14,3), 117(39,8), 116(10,7), 115(32,1), 106(7,1), 105(21,4), 104(10,7), 103(10,7), 102(7,1), 92(10,7), 91(57,1), 79(7,1), 78(7,1), 77(10,7), 73(21,4), 67(7,1), 65(12,5), 63(7,1).
- 22: 247(4,3), 246(M^+ 21,7), 231(1,1), 175(2,2), 147(3,3), 145(3,3), 133(2,2), 119(7,6), 117(10,5), 115(6,5), 106(59,8), 105(100), 104(25), 103(16,3), 92(8,9), 91(57,6), 79(27,2), 77(27,2), 69(9,2), 65(4,3), 57(23,9), 55(43,5), 43(54,3), 41(54,4), m^* 101,03(105+103), 59,43(105+79).
- 23: 261(3,7), 260(M^+ 15,9), 246(1,2), 204(4,9), 203(19,5), 190(1,2), 189(8,5), 176(1,2), 175(7,3), 162(1,2), 161(15,6), 148(8,5), 147(51,2), 146(3,7), 145(3,7), 133(11), 131(7,3), 119(18,3), 118(11), 117(24,4), 116(3,7), 115(11), 106(8,5), 105(63,4), 104(48,8), 103(8,2), 92(26,8), 91(100), 85(4,9), 83(4,9), 79(7,3), 78(8,5), 77(11), 73(4,9), 71(4,9), 69(8,2), 65(8,5), 57(20,7), 55(26,8), 53(7,3), 51(7,3), 43(58,5), 41(63,4), 39(17,1), 29(59,8).
- 24: 260(M^+ 13,3), 244(6,6), 218(1,4), 217(7,5), 201(6,6), 187(2,5), 173(70), 148(4), 147(6,6), 145(4), 141(1,9), 134(4), 133(26,6), 132(4), 131(20), 130(4), 129(6,6), 128(6,6), 119(4), 118(4), 117(33,3), 116(4), 115(8), 105(20), 104(13,3), 103(4), 92(7,5), 91(100), 79(4), 78(5,1), 77(6,2), 65(4), 59(6,2), 57(7,5), 43(20), 41(23), 39(7,5), 29(13,3).

- 25: 261(1,5), 260(M^+ 9), 247(1,5), 245(4,5), 232(1,5), 231(13,4), 215(4,5), 207(3), 175(1,5), 173(3), 161(3), 160(1,5), 159(17,9), 147(6), 145(6), 133(9), 132(3), 131(20,9), 130(4,5), 129(10,5), 128(9), 127(3), 120(11,9), 119(77,6), 118(11,9), 117(59,7), 116(9), 115(13,4), 106(9), 105(37,3), 104(19,4), 103(10,5), 91(100), 90(23,9), 86(4,5), 85(1,5), 84(4,5), 79(9), 78(9), 77(10,5), 73(9), 71(9), 69(9), 63(9), 57(22,4), 55(26,9), 53(9), 51(9), 43(67,2), 42(10,5), 41(74,6), 29(65,7). m^* : 205,23(260→231), 86,09(159→117).
- 26: 244(M^+ 17,4), 149(13), 147(4,3), 146(13), 145(100), 143(17,4), 141(4,3), 131(13), 130(13), 129(26), 128(17,4), 127(4,3), 119(4,3), 118(10,4), 117(29,5), 116(8,7), 115(19,1), 105(17,4), 104(8,7), 103(4,3), 92(4,3), 91(43,4), 77(8,7), 73(17,4), 57(8,7), 55(12,2), 43(26), 42(4,3), 41(29,5), 39(8,7), 29(19).
- 27: 261(2,8), 260(M^+ 9,7), 207(2,8), 189(1,4), 161(1,4), 147(2,8), 133(2,8), 119(6,9), 117(11,1), 115(4,2), 106(37,5), 105(100), 104(19,4), 103(11,1), 92(5,6), 91(69,4), 79(16,7), 77(18,1), 69(6,9), 57(20,8), 55(26,4), 43(63,9), 41(69,4). m^* : 101,03(105→103), 59,43(105→79).

6.3.2. Spectres de masse de composés non tabulés dans la littérature [29]

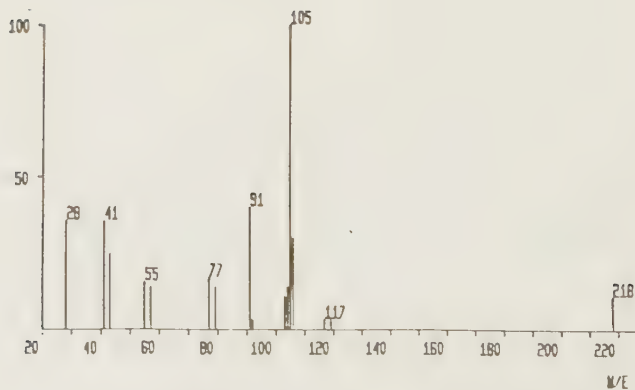
HEXADECANE

I.R.



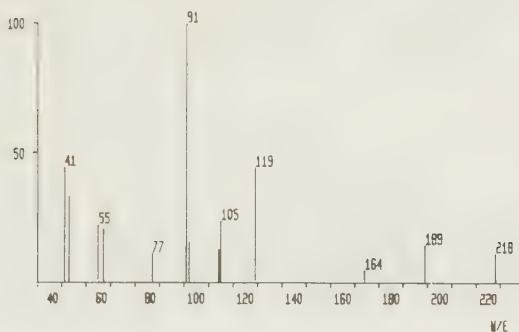
PHENYL-2 DECANE

I.R.



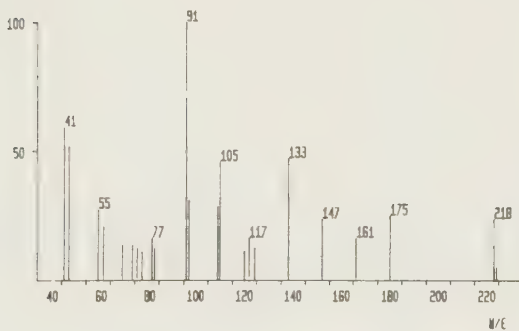
PHENYL-3 DECANE

I.R.



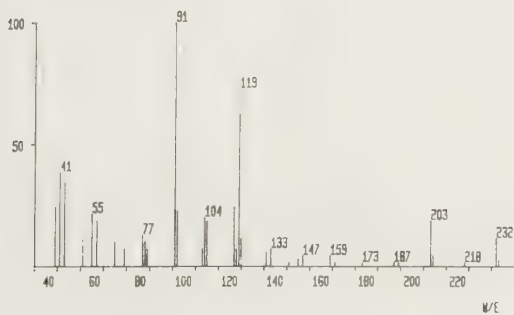
PHENYL-4 DECANE

I.R.



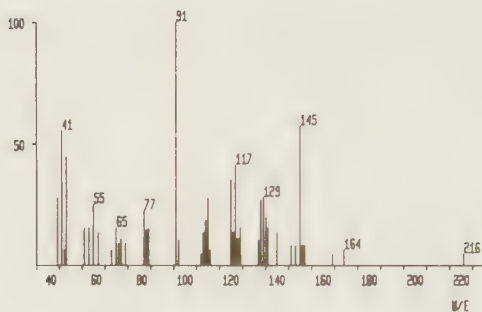
PHENYL-3 UNDECANE

I.R.



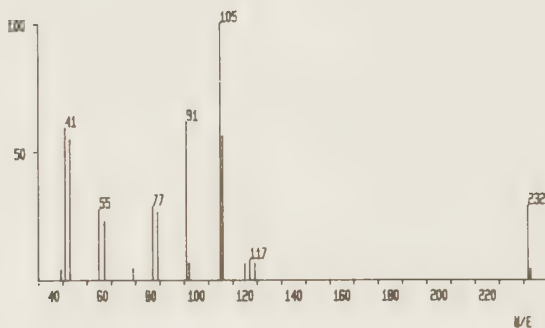
PHENYL-1 DECENE-3

I-R.



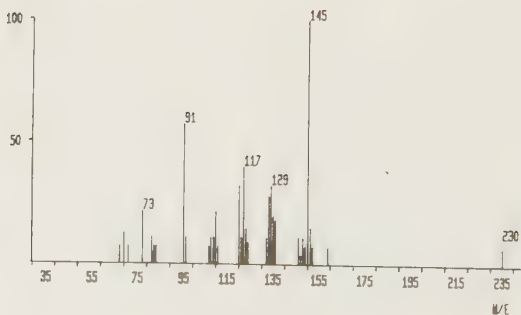
PHENYL-2 UNDECANE

I-R.



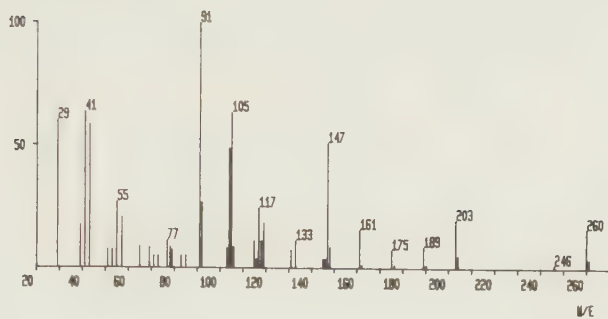
PHENYL-5 UNDECENE-3

I-R.



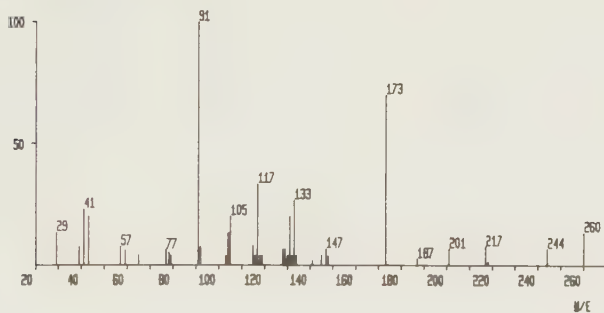
PHENYL-5 TRIDECANE

I.R.



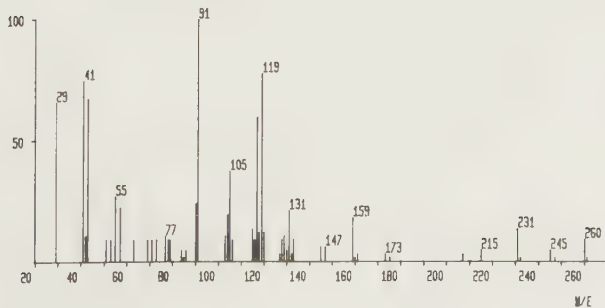
PHENYL-4 TRIDECANE

I.R.



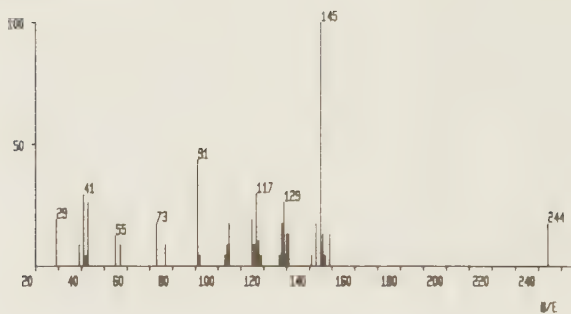
PHENYL-3 TRIDECANE

I.R.



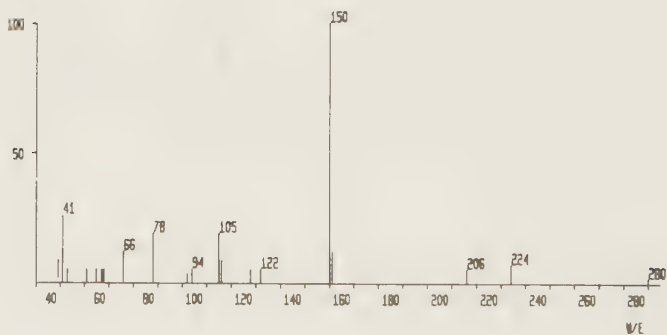
PHENYL-5 DODECENE-3

I.R.

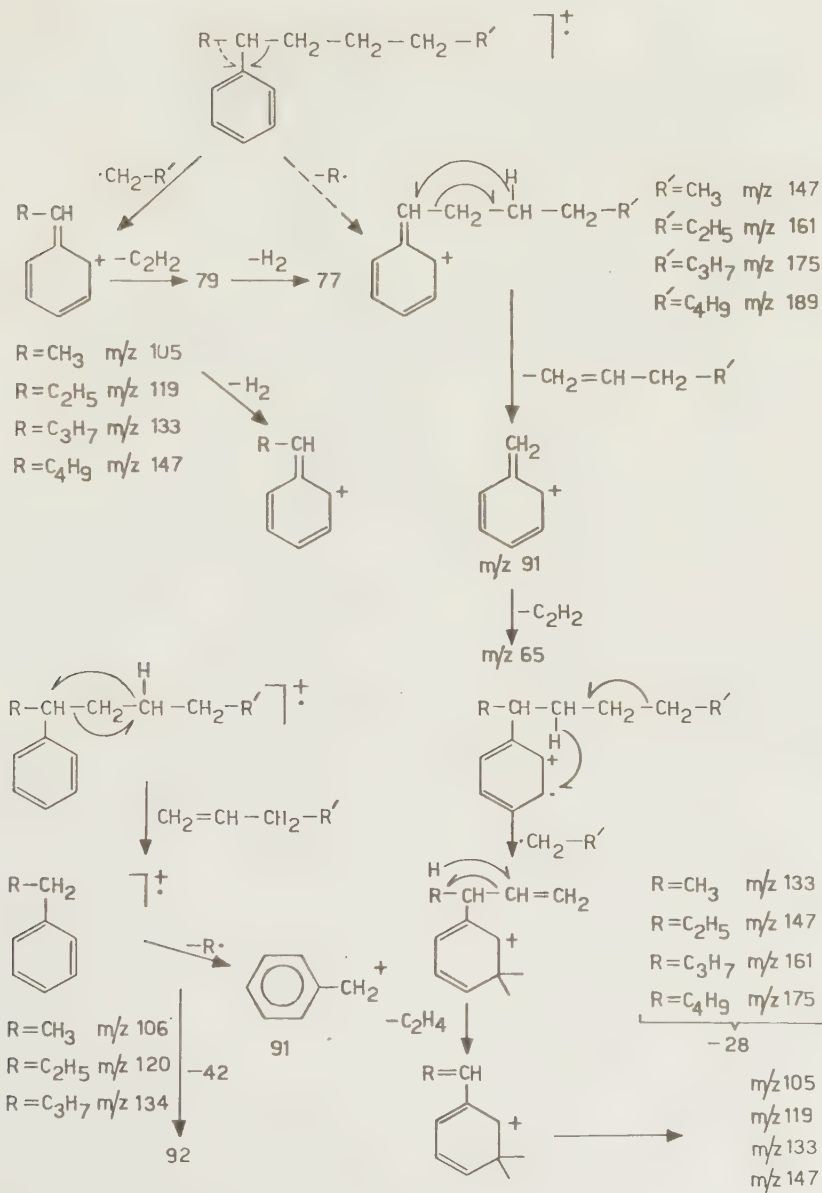


LETONE OU ESTER AROMATIQUE

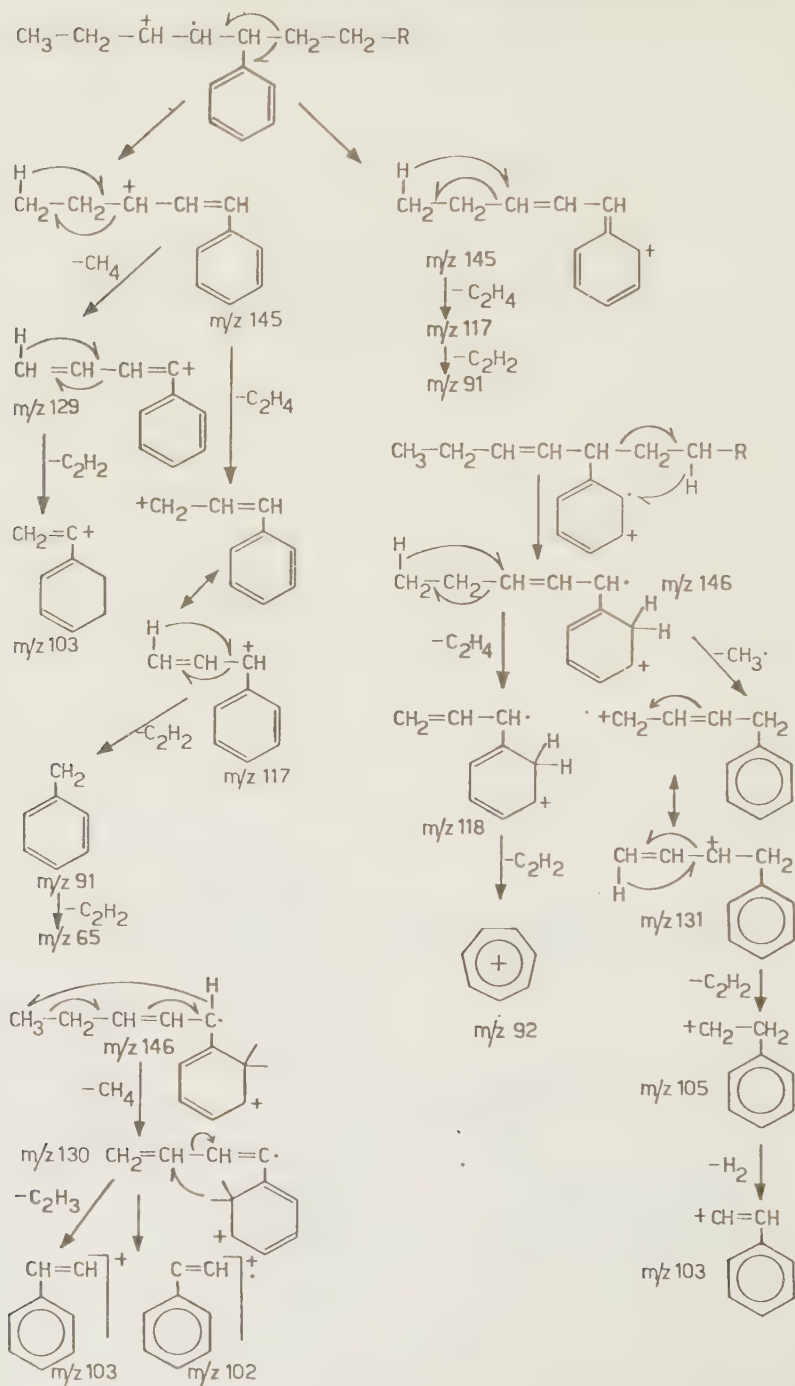
I.R.



6.3.3. Schéma de fragmentation de phényl-2,3,4,5 alcane



6.3.4. Schéma de fragmentation des phényl-1,5 alcène-3



6.4. Fraction neutre d'une concrète hexanique

6.4.1. Introduction

La concrète hexanique provient d'un extrait industriel de mousse de chêne, Evernia prunastri de Yougoslavie, traitée selon le schéma 4, avec les modifications suivantes:

Le filtrat éthéré est séparé de ses acides par extraction à NaHCO_3 15%, et de ses bases par HCl 2N; ensuite, les neutres de ce filtrat éthéré sont distillés. Nous obtenons ainsi trois fractions qui distillent à

27-30°C/20 mmHg (I),

40-80°C/ 4 mmHg (II) et

70-90°C/0,6 mmHg (III).

Les fractions I et II analysées par CG-SM ne nous ayant pas permis d'isoler d'autres composés que ceux identifiés par Gavin [17], nous ne mentionnerons que l'analyse de la fraction III, dont nous donnons le chromatogramme.

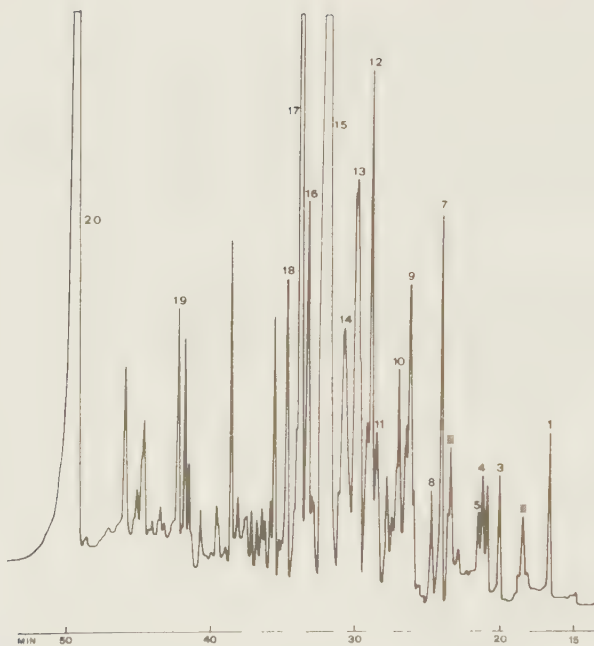


Fig. 75: Chromatogramme de la fraction lourde.
(Eb: 70-90⁰/0.6 Torr).
Colonne SCOT. Carbowax 20M, 60-230⁰, 4⁰/min.

Tableau 7 : Composition chimique de la fraction hexanique (III)

No Pic	M ⁺	Substances	Tr ¹⁾
1	184	tridecane	0,560
2	212	farnésane	0,640
3	198	tétradécane	0,703
4		α- et β-thuyones	0,742
5	226	méthyl-2 pentadécane	0,773
6	204	α-copaène	0,840
6'	212	n-pentadécane	0,869
7	204	β-gurjunène	0,881
7'	136	linalool	0,881
8	210	pentadécène-1	0,906
9	204	longifolène	0,966
9'	154	menthène-1 ol-4	0,966
10	204	caryophyllène	1,000
10'	226	n-hexadécane	0,996
11	204	thuyopsène	1,062
12	136	α-terpinéol	1,076
13	204	β-humulène	1,102
14	204	β-sélinène	1,157
14'	240	heptadécane	1,157
15	152	éther diméthylque de l'orcinol	1,212
16	186	chloro-2 diméthoxy-3,5 toluène	1,259
17	236	heptadécadiène-1,6	1,279
18	172	chloro-2 méthoxy-3 méthyl-5 phénol	1,319
19	150	thymol	1,625
20	138	éther méthylque de l'orcinol	1,931

1) Tr: indice de rétention des produits par rapport au caryophyllène

6.4.2. Spectres de masse des composés nouvellement identifiés dans la fraction hexanique (III).

- 1: 184(M^+ 15), 99(48), 98(25), 97(15), 85(58), 71(63), 69(18), 57(90), 55(60), 43(100), 41(72), 29(66), 27(58).
- 2: 212(M^+ 3), 188(13), 113(17), 112(17), 99(17), 97(17), 85(58), 83(17), 71(92), 70(53), 69(53), 57(100), 55(67), 43(88), 41(90), 29(73), 27(25).
- 3: 198(M^+ 14), 124(14), 99(18), 97(9), 85(64), 83(18), 71(77), 70(27), 69(27), 57(100), 55(61), 42(15), 41(83), 29(55), 27(37).
- 5: 226(M^+ 4), 141(21), 140(17), 121(21), 118(21), 109(21), 107(21), 105(21), 85(73), 71(98), 57(100), 55(76), 43(99), 42(21), 41(94), 39(21), 29(39), 27(29).
- 6: 212(M^+ 16), 99(40), 97(9), 95(16), 85(86), 84(10), 83(16), 71(86), 70(28), 69(28), 57(100), 56(38), 55(66), 43(98), 42(18), 41(92).
- 7: 204(M^+ 100), 189(45), 161(74), 147(39), 133(26), 119(54), 107(47), 105(59), 95(12), 93(12), 91(40), 81(36), 79(36), 77(24), 55(42), 43(47), 41(47), 39(36).
- 8: 210(M^+ 7), 111(9), 98(9), 97(69), 96(9), 95(9), 85(27), 71(65), 70(65), 69(74), 68(68), 67(18), 57(91), 56(71), 55(89), 43(100), 41(98), 39(27).

- 9: 204(M^+ 54), 189(54), 161(100), 147(40), 135(40), 133(40), 121(75), 119(75), 109(50), 107(50), 105(50), 95(60), 91(60), 79(60), 77(30), 67(20), 55(30), 41(40).
- 10: 226(M^+ 27), 99(27), 85(72), 83(38), 71(93), 70(38), 57(100), 43(95), 39(73).
- 11: 204(M^+ 36), 189(27), 161(28), 148(9), 147(9), 133(18), 121(27), 119(36), 109(36), 107(36), 105(36), 95(27), 93(67), 91(36), 83(27), 81(36), 79(36), 67(46), 55(78), 43(84), 41(100).
- 14: 240(M^+ 49), 99(18), 98(9), 85(74), 71(99), 57(71), 56(69), 43(100), 39(81).
- 17: 236(M^+ 86), 208(21), 161(14), 138(48), 137(48), 124(48), 123(48), 110(81), 109(81), 97(70), 96(88), 95(74), 83(88), 82(90), 81(98), 69(88), 67(96), 56(72), 55(100), 43(87), 41(97).
- 18: 174(M^+ 33), 172(100), 143(8), 121(34), 107(34), 93(18), 77(9), 57(17), 55(17), 53(17), 51(17), 43(26), 41(17), 39(17).

7. Comparaison entre la composition chimique de la mousse sèche de Yougoslavie et la concrète industrielle, et comparaison taxonomique entre des mousses de chêne de différentes provenances.

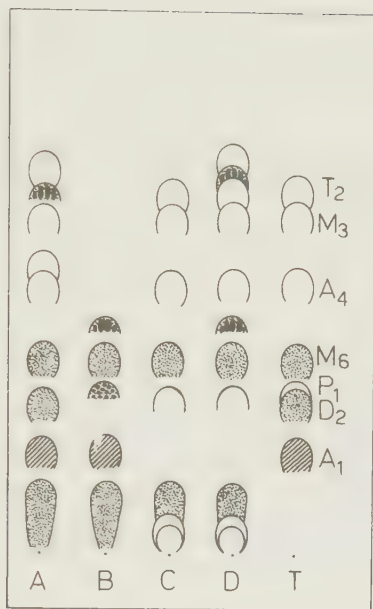
7.1. Comparaison entre témoins de concrète industrielle de chêne de Yougoslavie et extraits de mousse sèche pulvérisée.

Cette comparaison ne s'effectuera qu'au niveau des composés monoarylés et depsidiques, les autres composés identifiés par CG/SM ou les différents acides gras ne seront pas pris en considération.

La première partie de notre travail, ainsi que celui de Gavin [17], ont contribué, dans une large mesure, à la connaissance de la concrète industrielle de mousse de chêne de Yougoslavie. Le procédé d'extraction industriel, conduisant à la concrète, ainsi que le stockage, peuvent en principe produire des dégradations des composés polyphénoliques.

Afin de s'assurer de la présence des mêmes composés monoarylés et depsidiques dans la mousse sèche, nous avons traité celle-ci d'une manière plus douce et mieux contrôlée en laboratoire.

L'extraction a été effectuée selon le schéma 5, à partir de 100 g de mousse sèche pulvérisée. L'extrait éthéré a donné 6,3 g, dont 5,5 g d'acide usnique. Ses chromatogrammes sur trois systèmes de solvant des autres extraits, ainsi que celui de l'extrait éthéré avec les témoins connus, sont représentés ci-dessous (fig. 76).



Support: silicagel
 Solvant: Lignoïne-AcOEt
 8 : 2
 Révélateur: UV₂₅₄ et 260 nm

● : rouge UV_{360nm}
 ● : bleu pâle UV_{254nm}
 ● : jaune visible et brun UV_{360nm}
 ● : jaune visible et bleu UV_{254nm}

Fig. 76: Chromatogramme de comparaison: témoins et extrait de mousse sèche de chêne de Yougoslavie

A: extrait éthéré B: extrait au toluène
 C: extrait toluène-éthanol D: extrait à l'éthanol

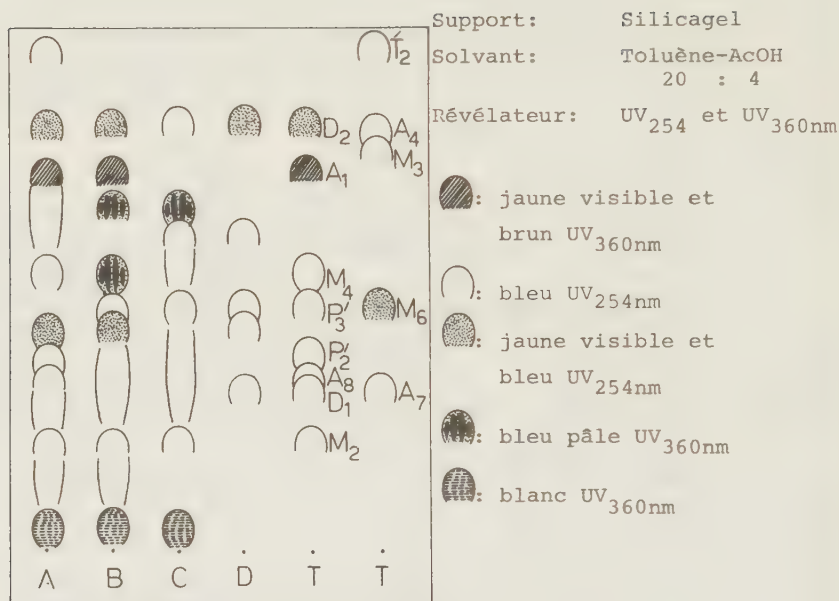


Fig. 77: Chromatogramme de comparaison; témoins et extraits de mousse sèche de chêne de Yougoslavie.

Remarques

- I. On constate que l'extrait étheré est le plus riche en composés photosensibles à la lumière UV.
Dans les différents extraits, plusieurs spots ne figurent pas dans les témoins, donc n'ont pas été isolés.
- II. L'acide usnique est toujours présent dans deux extraits, bien qu'il ait été préalablement éliminé, lors de la concentration de l'extrait étheré.

III. L'abondance des composés monoarylés constatée dans la concrète industrielle ne se reflète pas dans les différents extraits. Ainsi, seuls le β -orcine-carboxylate de méthyle, le sparassol, l'acide éverninique, l'acide orsellinique semblent être présents, ce qui nous laisserait supposer que lors du traitement industriel de la mousse, une hydrolyse partielle s'effectue.

IV. La différence de polarité des solvants des chromatogrammes nous permet de voir de façon plus nette dans la mousse sèche de chêne la présence de plusieurs composés, isolés de la concrète.

Ceci confirme bien que la présence de ces substances n'est pas due à des artefacts. En effet, dans la fig. (76) on note la présence de l'évernine (A_4), du méthyl-3' lécanorate de méthyle (P_1) et de l'ester haematomique (T'_2).

Dans la fig.(77), il est plus difficile d'affirmer la présence des divers témoins puisqu'ils apparaissent à des R_f très proches; toutefois, nous constatons la présence de l'acide méthyl-3' évernique (P_3) dans l'extrait toluène-éthanol, de l'acide évernique et de l'atranorine.

Afin de différencier encore mieux cette partie du chromatogramme, nous avons choisi un troisième système de solvant qui nous permet (fig.78) d'identifier à l'aide de nos témoins, les constituants de l'extrait étheré de mousse sèche de Yougoslavie, de façon plus sûre.

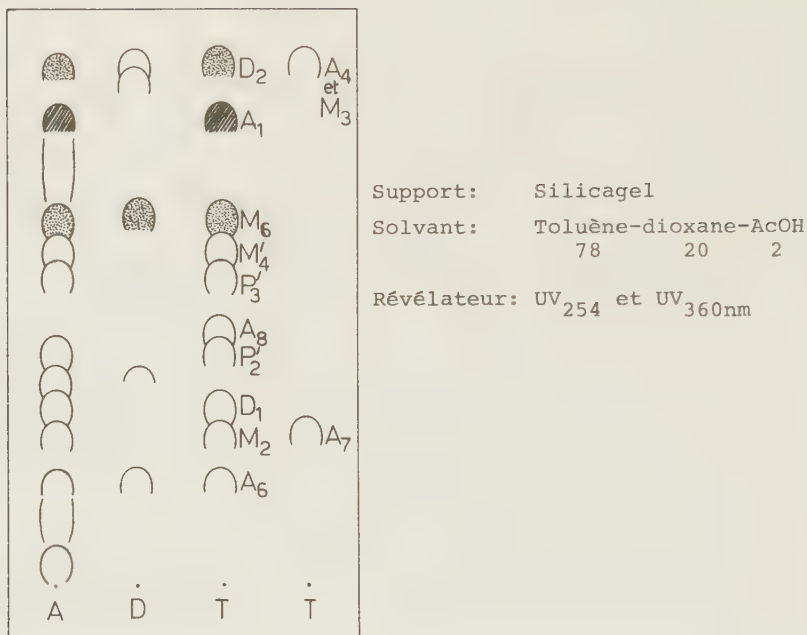


Fig.78: Chromatogramme de comparaison témoins et extraits de mousse sèche de chêne de Yougoslavie.

V. Sur la base de ce chromatogramme, nous pouvons conclure que malgré certains recouvrements, tous les composés identifiés dans la concrète industrielle se retrouvent dans les extraits de mousse sèche de chêne de Yougoslavie.

7.2. Comparaison taxonomique entre des mousses de chêne de différentes provenances.

Par cette étude, nous avons voulu vérifier en chromatographie sur couche mince, si la composition chimique de la mousse de chêne varie suivant la région ou l'habitat, où le lichen s'est développé.

Plusieurs travaux ont déjà été publiés sur la valeur chimiotaxonomique des substances lichéniques [30 - 32].

Ramant et Corvisier [33] ont entrepris un dosage spectrophotométrique de l'acide évernique sur Evernia prunastri, récolté en différents endroits de France au printemps et en hiver, une variation de la quantité en fonction de la période (hiver), de la récolte à été notée, la comparaison entre les différents sites ne fut pas du tout significative. D'autres [30] ont effectué un dosage sur CCM de l'acide usnique chez Evernia prunastri et sont arrivés à la conclusion qu'il était impossible de le détecter de façon sûre.

Notre essai a, pour but, de comparer entre elles trois mousses de chêne (de France, du Maroc et de Yougoslavie), et avec les substances isolées au cours de notre travail. Les trois mousses ne diffèrent que très peu de part leur aspect physique et morphologique. Toutefois, la mousse de France apparaît plus grise, la mousse de Yougoslavie est plus jaune, et celle du Maroc, enfin, est très semblable à celle de France, mais de couleur plus claire.

L'extraction au soxhlet à partir de 100 g de matériel séché et pulvérisé est résumée au schéma 5.

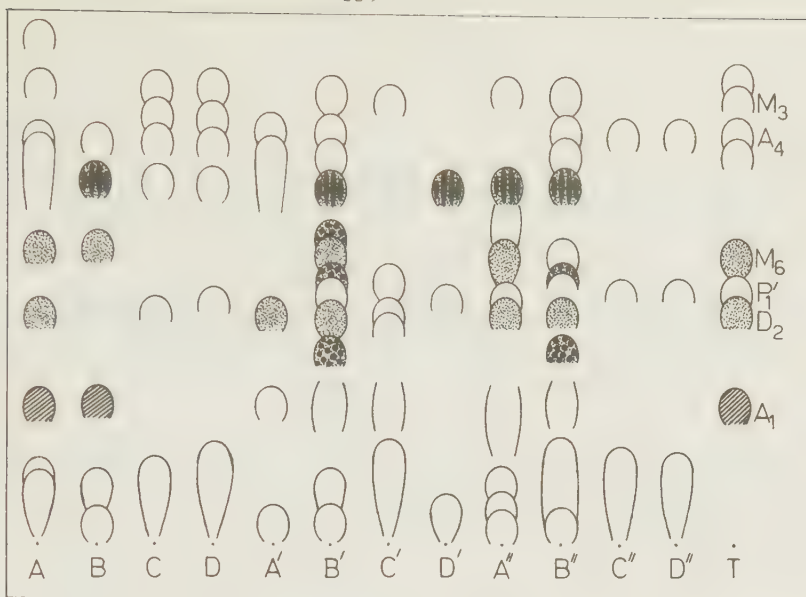
- La première grande différence est observée sur l'extrait éthéré des trois mousses. En effet, en concentrant ce dernier, il se forme un précipité, qui est de nature différente selon les mousses: nous obtenons 2,75 g d'acide évernique pur pour la mousse de France, 3,1 g d'un mélange à 50% d'acide évernique et d'atranorine pour la mousse du Maroc et 5,5 g d'acide usnique, 0,8 g d'acide évernique pour la mousse de Yougoslavie.

Ainsi, sachant que l'acide usnique apparaît sous forme de cristaux jaunes, on comprend mieux la différence de coloration des mousses vue plus haut.

Nous avons porté les extraits des mousses sur couches minces et fait migrer les plaques dans deux systèmes de solvants, de polarité différente. Du premier chromatogramme (fig. 79), nous pouvons tirer les renseignements suivants:

- Les trois mousses contiennent de l'atranorine (D_2), du β -orcine-carboxylate de méthyle (M_6), du sparassol (M_3), de l'évernine (A_4), du méthyl-3' lécanorate de méthyle (P'_1) et de l'acide usnique (A_1).

A propos de ce dernier, et contrairement au travail de Culberson [32], nous constatons qu'il apparaît dans toutes les mousses, sa détection se fait facilement dans le cas de la mousse de Yougoslavie, mais on peut le détecter de façon plus sûre pour les autres mousses, où il n'apparaît qu'en trace, en révélant la plaque avec le mélange vanilline-acide sulfurique. Il apparaît alors en bleu foncé, les autres spots étant de couleur rouge.



Support: Silicagel

Révéléateur: UV₂₅₄ et 360nm

Solvant: Ligroïne-AcOEt (8:2)

- A : extrait étheré de mousse de chêne de Yougoslavie
 A' : extrait étheré de mousse de chêne de France
 A'' : extrait étheré de mousse de chêne du Maroc
 B : extrait au toluène de mousse de chêne de Yougoslavie
 B' : extrait au toluène de mousse de chêne de France
 B'' : extrait au toluène de mousse de chêne du Maroc
 C : extrait au toluène-éthanol de mousse de chêne de Yougoslavie
 C' : extrait au toluène-éthanol de mousse de chêne de France
 C'' : extrait au toluène-éthanol de mousse de chêne du Maroc
 D : extrait éthanologique de mousse de chêne de Yougoslavie
 D' : extrait éthanologique de mousse de chêne de France
 D'' : extrait éthanologique de mousse de chêne du Maroc

Fig. 79 : Chromatogramme de comparaison

- La mousse de France semble contenir plusieurs spots non identifiés, apparaissant en rouge à l'UV_{360nm}. Il pourrait s'agir de pigments ou d'anthocyanes.
- Les trois mousses présentent encore des substances non identifiées, lesquelles pourraient correspondre à des composés monoarylés ou à des triterpènes.

Le chromatogramme fig. (30) nous permet de différencier les depsides et les composés monoarylés porteurs de fonctions acides (donc plus retenus).

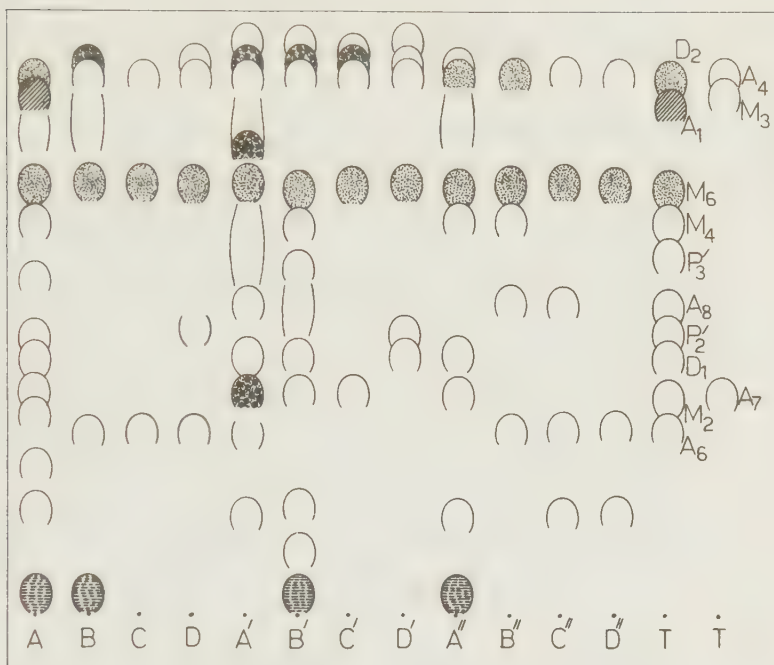
Les trois mousses contiennent, de façon sûre, l'acide éverninique (M_4), l'acide méthyl-3' évernique (P'_3), l'acide orsellinique (M_2), l'acide lécanorique (A_6) et l'acide évernique (D_1). A propos de ce dernier, nous pouvons dire que la mousse de Yougoslavie en contient peu.

Pour les autres acides, tels que prunastrique (A_8), O-diméthyl-4,2" gyrophorique (P'_2) et O-méthyl-2' évernique (A_7), ils existent, mais il est difficile de le certifier du fait d'un certain recouvrement des spots.

En résumé, nous pouvons dire que les trois mousses ont presque la même composition chimique, mais elles diffèrent d'un point de vue quantitatif.

Il est difficile de juger cet aspect sur couche mince avec les moyens que nous possédons. Nous avons, d'autre part, essayé de faire cette même comparaison par HPLC, mais trop de composés se recouvraient.

L'explication de ces quelques différences observées dans la composition des mousses de provenance différente, doit vraisemblablement se rapporter, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre d'introduction, à l'habitat du lichen.



Support: Silicagel

Solvant: Toluène-Dioxane-AcOH

78 20 2

Révélateur: a) UV_{254} et 360nm

b) Vanilline+ H_2SO_4 tous les spots apparaissent en rouge clair, exception faite pour A_1 en bleu.

Fig. 80 : Chromatogramme de comparaison

8. Synthèse de depsides

8.1. Introduction

Les différentes synthèses que nous allons exposer ont pour but premier de vérifier les hypothèses de structures avancées au chapitre 5. Elles nous permettront aussi de faire connaissance avec la chimie des composés aromatiques et avec leur réactivité.

Bien que certaines réactions semblent à priori très simples schématiquement, au point de vue expérimental, elles nous ont posé passablement de problèmes, en particulier lors des séparations et des cristallisations.

Des composés obtenus, presque toutes les synthèses effectuées passent par des intermédiaires communs, qui sont substitués ensuite différemment, et condensés entre eux.

Afin de mieux comprendre ce chapitre, nous rappellerons qu'un depside est constitué de deux unités:

- acide, symbolisé par S (säure), et
- alcool, symbolisé par A.

Une fois ces deux unités obtenues, il faut les condenser en ayant soin de protéger sélectivement les groupements pouvant réagir lors de la condensation.

Ainsi, nous pouvons résumer notre méthode de synthèse en trois points:

- protection de groupes fonctionnels
- synthèse d'intermédiaires
- condensation et synthèse du depside

8.2. Protection de groupes fonctionnels

Le choix du groupe protecteur doit être fait de telle sorte que la régénération puisse s'effectuer dans les meilleures conditions, c'est-à-dire en milieu neutre, pour éviter des réactions imprévues.

Dans les synthèses qui nous occupent, deux groupes fonctionnels doivent être protégés: les acides et les alcools.

Pour ces deux fonctions, le choix du groupe protecteur s'est porté sur les groupes benzyles, l'hydrogénolyse catalytique (H_2/Pd) étant inactive au niveau du reste de la molécule. Toutefois, lorsque nous avons, sur un cycle aromatique, deux hydroxyles benzylés, il n'est pas possible d'effectuer l'hydrogénolyse catalytique dans des conditions habituelles, sauf après une longue période (15 jours) dans des conditions de température ($60^\circ C$) et de pression (H_2) (10 atm) anormales, le groupe protecteur peut être enlevé.

Dans notre cas, nous avons bénéficié du fait que les groupes hydroxyles en ortho d'une fonction carboxylique sont protégés cinétiquement et moins réactifs, grâce aux liaisons hydrogènes existantes.

Ainsi, nous avons pu effectuer des benzylations et méthylations d'hydroxyles de façon sélective.

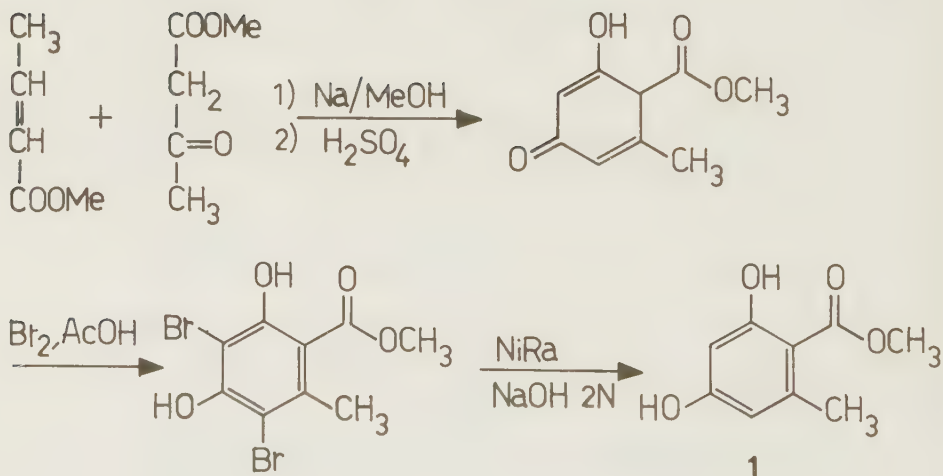
8.3. Synthèse d'intermédiaires

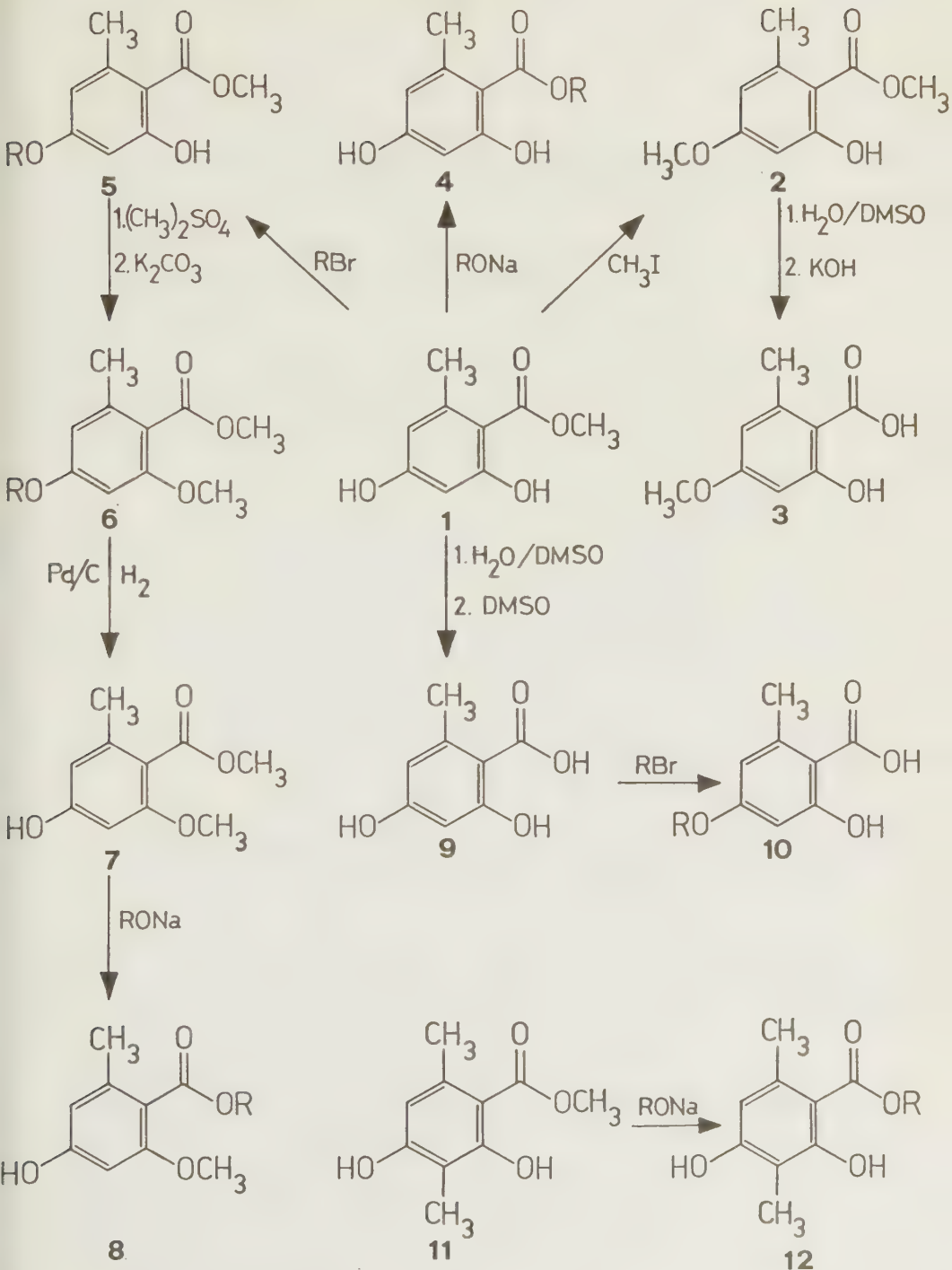
Au cours de notre travail, nous avons isolé surtout des para-depsides de type β -orcinol et orcinol; et un méta-depside type orcinol. Notre point de départ sera, par conséquent, la

synthèse de l'orsellinate de méthyle. A partir de ce composé, nous obtiendrons tous les autres intermédiaires nécessaires aux différentes synthèses.

8.3.1. Synthèse de l'orsellinate de méthyle

Cette synthèse étant abondamment décrite dans la littérature [33] , nous en donnerons que le principe sous forme d'un schéma.





R: $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

8.3.2. Synthèse de l'hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoate de méthyle (sparassol) (2)

A une solution de 20 g (0,11 mol) de (1) dans 850 ml d'acétone anhydre, sont ajoutés 24 g (0,17 mol) d'iodure de méthyle et 23,8 g (0,17 mol) de K_2CO_3 fraîchement calciné. Le tout est chauffé à reflux sous agitation pendant trois heures. Après avoir essoré les sels insolubles, l'acétone est évaporée et le résidu solide directement investi dans l'hydrolyse basique aqueuse, F. 66-67°.

IR (KBr): 2910m, 1635f, 1605f, 1565m, 1440m, 1320f, 1260f, 1145f, 1034m, 945m, 800f.

1H -RMN ($CDCl_3$): 2,48(s,3H, CH_3 -Ar), 3,77(s,3H, CH_3O -Ar), 3,80(s,3H, CO_2CH_3), 6,30(s,2H,H-Ar), 11,72(s,1H,OH).

MS(I%): 196(M^+ , 85), 165(72), 164(100), 136(85), 121(31), 108(15), 93(31), 65(18).

8.3.3. Synthèse de l'acide hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoïque (acide éverninique) (3)

Le résidu de la réaction précédente est dissous dans 200 ml de NaOH 2N et chauffé à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement et acidification par acide chlorhydrique glacé, la suspension obtenue est extraite à l'éther. Après évaporation du solvant, le résidu est recristallisé dans la ligroïne. Rdt. (méthylation + hydrolyse): 5 g (25%). F. 170°.

IR (KBr): 2560m, 1610f, 1570m, 1450f, 1355f, 1255f, 1190m, 1155m, 1030m.

^1H -RMN (DMSO- D_6): 2,50 (s, 3H, CH_3 -Ar), 3,82 (s, 3H, CH_3O -Ar), 6,42 (s, 2H, H-Ar), 11,0 (s, 2H, COOH +OH).

MS (I%): 182 (M^+ , 20), 164 (40), 138 (100), 136 (15), 109 (30), 108 (18), 107 (35).

8.3.4. Synthèse du dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de benzyle (4)

1 g de sodium est dissous dans 75 ml d'alcool benzylique (fraîchement distillé sous azote) sous azote. A la solution limpide, on ajoute 5 g (27,4 mol) d'orsellinate de méthyle (6). La solution jaune claire est maintenue à 120-130°C pendant 22 heures sous agitation et sous atmosphère inerte. Un précipité jaune clair apparaît après une à deux heures de réactions. Après refroidissement, le mélange réactionnel est versé dans HCl dilué froid. La suspension acide est extraite à l'éther, les phases éthérées sont lavées successivement à l'eau, avec une solution de NH_4Cl , puis à l'eau. Après séchage sur MgSO_4 , l'éther est évaporé. Le résidu est recristallisé dans le cyclohexane. Rdt. 64%. F. 137°.

SM(m/z, I%): 258 (M^+ , 4), 151 (5), 150 (8), 122 (9), 109 (7), 108 (70), 107 (69), 92 (73), 91 (100), 80 (12), 79 (73), 77 (60), 69 (30), 65 (70), 55 (43), 53 (45), 43 (45), 41 (50).

8.3.5. Synthèse du O-benzyl-4 hydroxy-2 méthyl-6 benzoate de méthyle (5)

Un mélange de 50 ml d'acétone anhydre, 7 g de K_2CO_3

fraîchement calciné, 1,7 ml de bromure de benzyle fraîchement distillé et 2,5 g d'orsellinate de méthyle (1) est porté à reflux sous agitation pendant 5-8 heures (réaction contrôlée par CCM sur silicagel, toluène/acide acétique 20:3). Le mélange réactionnel est ensuite versé dans acide chlorhydrique dilué froid. La suspension est extraite à l'éther; la phase organique est séchée et évaporée; le résidu huileux cristallise à froid. Rdt. produit brut: 3 g. F. 45-50°; utilisé directement pour l'hydrolyse.

IR (KBr): 2980m, 1710m, 1650s, 1615s, 1575vs.

^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz): 2,48(s,3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 3,85(s,3H, $\text{CH}_3\text{OCO-Ar}$), 5,00(s,2H, $\text{OCH}_2\text{-Ar}$), 6,35(s,2H,H-Ar), 7,30(s,5H,H-Ar).

SM (m/z, I%): 272(M^+ 97), 241(18), 240(61), 211(11), 181(5), 150(5), 122(5), 121(12), 92(32), 91(100), 65(34).

8.3.6. Synthèse du O-benzyl - 4 méthoxy-2 méthyl-6 benzoate de méthyle (6)

11 g de (5), 4 ml de sulfate de méthyle, 17 g de K_2CO_3 et 120 ml d'acétone sont chauffés à reflux 10 heures sous agitation. La réaction est contrôlée par CCM (silicagel, toluène/acide acétique 20:3). Le mélange réactionnel est ensuite versé dans acide chlorhydrique dilué froid. La suspension acide est extraite à l'éther, les phases étherées sont séchées et évaporées. On obtient 10 g de résidu huileux (6) (87%) utilisés directement pour l'hydrogénolyse.

8.3.7. Synthèse de l'hydroxy-4 méthoxy-2 méthyl-6 benzoate de méthyle (7). (Isoéverninate de méthyle)

A la solution de 10 g de (6) dans 300 ml d'acétate d'éthyle, on ajoute 2 g de Pd/C à 10%. La suspension est agitée une nuit sous H₂. Lorsque la consommation d'hydrogène a cessé, la catalyseur est essoré sur verre fritté, puis le solvant est évaporé. Rdt.: résidu solide (7): 5 g (71%). F. 110-112° (ligroïne).

SM (m/z, I%): 196(M⁺, 80), 183(24), 182(96), 165(91), 164(47), 151(78), 150(100), 123(17), 122(85), 121(32), 109(10), 107(11), 94(45), 77(15), 69(47).

8.3.8. Synthèse de l'hydroxy-4 méthoxy-2 méthyl-6 benzoate de benzyle (8). (Isoéverninate de benzyle)

5 g de (7) sont traités de la manière décrite plus haut avec l'orsellinate de méthyle (1) pour donner 4,5 g d'une huile jaune. Après 2 passages sur résine Sephadex LH20 (MeOH), le produit (8) reste huileux.

¹H-RMN (CDCl₃, 60 MHz): 2,1(s, 3H, CH₃-Ar), 3,55(s, 3H, CH₃O-Ar), 5,25(s, 2H, OCH₂-Ar), 6,20(s, 2H, H-Ar), 6,75 (large, 1H, OH), 7,3(s, 5H, H-Ar).

8.3.9. Synthèse de l'acide orsellinique (9)

Nous hydrolysons 3 g de l'orsellinate de méthyle (1) dans NaOH 2N, en chauffant à reflux 2 heures. Après acidification, nous extrayons l'acide orsellinique à l'éther que nous recristallisons dans un mélange mé-

thanol-eau. Rdt: 80%, F. 175°.

SM (m/z, I%): 168(M⁺, 55), 150(100), 122(55), 94(20), 68(20), 67(18). m^{*}: 133,93(168+150), 99,23(150+122), 72,43(122+94).

8.3.10. Synthèse de l'acide O-benzyl-4 orsellinique (10)

La benzylation en 4 est effectuée à l'aide du bromure de benzyle et de K₂CO₃ comme pour la préparation de 5. Le résidu huileux est cristallisé dans benzène/acétone, F. 167-170°.

¹H-RMN (DMSO D₆, 60 MHz): 2,50(s,3H,CH₃-Ar), 5,2(s,2H,OCH₂-Ar), 6,53(s,2H,H-Ar), 7,50(s,5H,H-Ar).

8.3.11. Synthèse du β-orcine-carboxylate de méthyle (11)

Nous n'avons pas eu besoin de synthétiser ce produit, ayant utilisé le produit naturel extrait directement de la mousse de chêne. F. 140-143° (CH₃OH/H₂O, puis ligroïne).

IR (KBr): 3440f, 3080m, 2970m, 2920m, 1615f, 1490m, 1470m, 1300f, 1270f, 1175m, 1100f, 1010m, 790m.

¹H-RMN (CDCl₃): 2,11(s,3H,CH₃-Ar), 2,47(s,3H,CH₃-Ar), 3,92(s,3H,CO₂CH₃), 5,28(s,1H,OHp), 6,23(s,1H,H-Ar), 12,0(s,1H,OHo).

SM (m/z, I%): 196(M⁺, 68), 185(8), 186(8), 165(40), 164(100), 136(90), 107(20), 78(13), 79(12), 55(10).

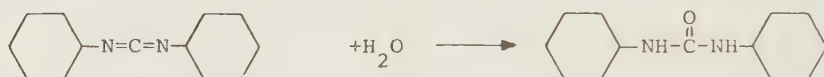
8.3.12. Synthèse du dihydroxy-2,4 diméthyl-3,6 benzoate de benzyle (12). (β -orcine-carboxylate de benzyle)

A 20 ml d'alcool benzylique, on ajoute sous N_2 0,1 g de Na puis 2 g de β -orcine-carboxylate de méthyle (11). La solution est agitée et chauffée à 130° pendant 18 heures. Le mélange est ensuite refroidi, versé dans l'acide chlorhydrique dilué froid et extrait à l'éther. La solution étherée est séchée ($MgSO_4$), puis l'éther est évaporé et l'excédent d'alcool benzylique distillé sous pression réduite. Le produit (17) est recristallisé dans l'hexane. Rdt. 70%, F. $114-117^\circ$.

1H -RMN ($CDCl_3$, 60 MHz): 2,09 (s, 3H, CH_3 -Ar), 2,4 (s, 3H, CH_3 -Ar), 5,1 (s, 1H, OH), 5,3 (s, 2H, OCH_2 -Ar), 6,1 (s, 1H, H-Ar), 7,32 (s, 5H, H-Ar).

8.4. Condensation: principe général

La condensation d'un acide et d'un alcool aromatique peut se faire par plusieurs méthodes. Fischer et St. Pfau [35/5] utilisaient les chlorures d'acides qu'ils faisaient réagir ensuite sur le phénol. Seshadri et al. [36] utilisèrent le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) mais les rendements ne furent pas toujours très favorables.



Brown et al. [37] et Elix [39] ont trouvé en utilisant l'anhydride trifluoroacétique, une méthode très simple et adaptée à toutes les condensations de composés monoarylés en depsides.



Nous donnons, ci-dessous, le procédé général que nous avons utilisé pour la condensation des depsides trouvés dans la mousse de chêne:

Les acides carboxyliques (3, 10 ou 26) (1 mol), et les esters phénoliques (1, 4, 8, 11 ou 12) ou le diacide (18) (1 mol), sont dissous dans une solution de toluène anhydre (4 ml) et

d'anhydride trifluoroacétique (1 ml) et laissés à température ambiante pendant 4 heures. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu recristallisé dans l'hexane ou le toluène.

Les solutions des depsides benzylés (0,5 mol) dans l'acétate d'éthyle (10 ml) sont agitées pendant 2 heures sous H_2 en présence de 30 mg de Pd/C à 10%. Le catalyseur est essoré et le solvant évaporé. Les depsides sont recristallisés dans les solvants appropriés.

8.5. Synthèse de l'évernine A₄

Nous condensons selon la méthode décrite plus haut l'acide hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoïque (acide éverninique) (3) avec le dihydroxy-2,4 diméthyl-3,6 benzoate de méthyle (β -orcine-carboxylate de méthyle) (11).

Nous recristallisons l'évernine dans le chloroforme. Rdt. 57% cristaux blancs. F. 112-114°.

Les données spectrales sont en accord avec celles du produit naturel (chap. 5).

8.6. Synthèse de l'acide lécanorique A₆

Nous condensons l'acide O-benzyl-4 orsellinique (10) avec le dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de benzyle (4). Nous obtenons ainsi le O-benzyl-4 lécanorate de benzyle recristallisé dans l'hexane, F. 117-120°. Rdt. 40%.

1H -RMN ($CDCl_3$, 60 MHz): 2,4 (s, 6H, CH_3 -Ar), 5,1 (s, 4H, OCH_2 -Ar + 2OH), 5,35 (s, 2H, OCH_2 -Ar), 6,45 (m, 4H, H-Ar), 7,35 (s, 10H, H-Ar).

Après hydrogénation catalytique, nous obtenons l'acide lécanorique A_6 . Rdt. 98%, recristallisé dans le cyclohexane, F. 127° . Les données spectrales sont en accord avec celles du produit naturel.

8.7. Synthèse de l'acide O-méthyl-2' évernique A_7

Nous condensons l'acide hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoïque (acide éverninique) (3) avec l'hydroxy-4 méthoxy-2 méthyl-6 benzoate de benzyle (isoéverninate de benzyle) (8). Nous obtenons le O-méthyl-2' évernate de benzyle sous forme d'huile jaunâtre.

^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz): 2,25(s,3H, CH_3 -Ar), 2,55(s,3H, CH_3 -Ar), 3,75(s,6H, CH_3O -Ar), 5,3(s, OCH_2 -Ar), 6,3(s,2H,H-Ar), 6,55(s,2H,H-Ar), 7,35(s,5H,H-Ar).

Après hydrogénation catalytique, nous obtenons l'acide O-méthyl-2' évernique A_7 . Rdt. 84%, recristallisé dans ligroïne/acétate d'éthyle. F. 162° .

Les données spectrales correspondent à celles observées pour le produit naturel A_7 (chap. 5).

8.8. Synthèse du méthyl-3' lécanorate de méthyle P₁'

Nous condensons l'acide O-benzyl-4 orsellinique (10) avec le dihydroxy-2,4 diméthyl-3,6 benzoate de méthyle (11). Nous obtenons le O-benzyl-4 lécanorate de méthyle. Rdt. 65% que nous recrystallisons dans MeOH. F. 115-118°.

¹H-RMN (CDCl₃, 60 MHz): 2,1(s,3H,CH₃-Ar), 2,5(s,3H,CH₃-Ar), 2,6(s,3H,CH₃-Ar), 3,8(s,3H,COOCH₃), 5,4(s,2H,OCH₂-Ar), 6,35(s,2H,H-Ar), 6,5(s,1H,H-Ar), 7,4(s,5H,H-Ar).

Après hydrogénation catalytique, nous obtenons le méthyl-3' lécanorate de méthyle P₁', recrystallisé dans le cyclohexane. F. 125-128°.

Les données spectrales sont en accord avec celles observées pour le produit naturel P₁' (chap. 5).

8.9. Synthèse de l'acide O-diméthyl-4,2" gyrophorique P₂'

Nous procédons en deux étapes pour ce tridepside, de façon à obtenir d'abord l'acide évernique et ensuite après une seconde condensation, le tridepside P₂'.

8.9.1. Synthèse de l'acide évernique

Nous condensons l'acide hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoïque (acide éverninique) (3) avec le dihydroxy-2,4 méthyl-6 benzoate de benzyle (4) pour obtenir l'évernate de benzyle, Rdt. 70%, recrystallisé dans MeOH. F. 93°.

^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz): 2,55 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{C}(6)$, $\text{CH}_3\text{-C}(6')$), 3,8 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-C}(4)$), 5,35 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{-Ar}$), 6,3 (2d, AB, J = 1 Hz, 2H, H-Ar), 6,6 (m, 2H, H-Ar), 7,35 (s, 5H, H-Ar), 11,35 (s, 1H, OH).

Après hydrogénation catalytique, nous obtenons l'acide évernique. Rdt. 80%, recristallisé dans cyclohexane/acétone. F. 170-171°.

UV (MeOH) λ_{max} : 305, 270, 230 nm.

^1H -RMN ($\text{DMSO } D_6$, 60 MHz): 2,43 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{C}(6)$, $\text{CH}_3\text{-C}(6')$), 3,84 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-C}(4)$), 6,50 (s, 2H, H-Ar), 6,75 (s, 2H, H-Ar).

8.9.2. Synthèse de l'acide O-diméthyl-4,2" gyrophorique

Nous condensons l'acide évernique obtenu plus haut avec l'isoéverninate de benzyle (8) pour avoir le O-diméthyl-4,2" gyrophorate de benzyle. Rdt. 33%, recristallisé dans hexane-acétone. F. 162-165°.

^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz): 2,25 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6')$), 2,60 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$), 2,86 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6'')$), 3,75 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{O-C}(4)$ et $\text{CH}_3\text{O-C}(2'')$), 5,32 (s, 2H, $\text{OCH}_2\text{-Ar}$), 6,33 (s, 2H, H-Ar), 6,60 (s, 4H, H-Ar), 7,35 (s, 5H, H-Ar), 11,2 (s, 2H, OH).

Après hydrogénation catalytique, nous obtenons l'acide O-diméthyl-4,2" gyrophorique 30% recristallisé dans hexane/acétone. F. 140-145°.

Les données spectrales sont semblables à celles observées pour le produit naturel P_2^1 .

8.10. Synthèse de l'acide méthyl-3' évernique P₃'

Nous condensons l'acide hydroxy-2 méthoxy-4 méthyl-6 benzoïque (acide éverninique) (3) avec le dihydroxy-2,4 diméthyl-3,6 benzoate de benzyle (β -orcine-carboxylate de benzyle) (12) pour obtenir le méthyl-3' évernate de benzyle. Rdt. 50%, recristallisé dans MeOH. F. 85-88°.

¹H-RMN (CDCl₃, 60 MHz): 2,1(s,3H,CH₃-Ar), 2,5(s,3H,CH₃-Ar), 2,6(s,3H,CH₃-Ar), 3,8(s,3H,CH₃O-Ar), 5,4(s,2H,OCH₂-Ar), 6,2-6,4(m,2H,H-Ar), 7,35(s,5H,H-Ar).

Après hydrogénation catalytique, nous obtenons l'acide méthyl-3' évernique P₃' recristallisé dans l'hexane. F. 159°.

Les données spectrales correspondent à celles enregistrées pour le composé naturel P₃'.

9. Discussion et Conclusion

L'objectif de notre travail -l'analyse qualitative totale d'une concrète benzénique de mousse de chêne de Yougoslavie- a été atteint.

Certes, il reste encore des composés inconnus, mais au niveau des substances lichéniques (depsides, dibenzofuranes et composés monoarylés); notre étude devrait être complète.

Ainsi, nous avons isolé, identifié et synthétisé sept depsides, dont six sont des nouveaux composés naturels et un est nouveau pour l'espèce *Evernia prunastri* (L.) Ach. A cela s'ajoute l'isolement et l'identification de cinq triterpènes, et l'identification par CG-SM de 50 autres composés. Dans le cadre de l'identification des depsides, nous avons enregistré, pour la première fois, les spectres ^{13}C -RMN de ce type de substances. Cette technique a permis d'établir avec certitude la structure et la configuration des depsides isolés.

Pour conclure notre travail, nous avons effectué une brève étude chimiotaxonomique sur des mousses sèches de chêne de diverses provenances. Ce dernier point nous a permis, par la même occasion, de comparer l'extrait industriel (concrète benzénique) et l'extrait de laboratoire (mousse sèche pulvérisée). Cette comparaison nous a montré que, pour un but chimiotaxonomique, il est préférable de partir uniquement du matériel sec. L'extraction industrielle conduit en effet à la présence de produits de dégradations (monqaryliques). En outre, avec l'extraction au laboratoire, nous avons pu opérer un tri beaucoup plus rigoureux et sélectif, évitant ainsi la présence parasite d'autres espèces et de résidus d'écorces. Cependant, la concrète industrielle a l'avantage de nous fournir une quantité plus

grande de composés volatils (hydrocarbures et composés terpéniques) que l'extrait de mousses sèches du laboratoire, où elles se trouvent en quantité trop faible pour être identifiées. Ces composés sont beaucoup moins sujets à des dégradations lors de l'extraction industrielle et leur présence dans la mousse peut être considérée comme sûre.

Les différents depsides isolés sont dérivés de l'orcinol et du β -orcinol et sont formés généralement par estérification intermoléculaires de deux ou trois unités identiques. Dans notre cas, certains depsides isolés constituent pour le cycle S une unité orcinol et pour le cycle A une unité β -orcinol. De plus, les depsides isolés n'ont pas de chaîne aliphatique. Ceci nous permet de dire que le genre *Evernia* est plus primitif que d'autres genres tels que *Ramalina*, *Cetraria*, *Cladonia* [14] ; la chaîne aliphatique étant en effet un attribut de genres et d'espèces plus évoluées. De plus, tous les depsides isolés comportent l'acide éverninique comme cycle S. Ce fait pourrait indiquer une particularité chimiotaxonomique qu'il serait intéressant de vérifier dans d'autres espèces du même genre ou dans un autre genre.

Les études sur la présence de triterpènes dans les lichens montrent que ces composés se rencontrent fréquemment. La présence de triterpènes dans *Evernia prunastri* (L.) Ach. n'est donc pas surprenante. Parmi les composés identifiés, seul l'acide ursolique et la friedeline sont largement répandus chez les lichens. Le lupéol a été identifié uniquement chez *Cetraria nivalis* (L.) Ach. [39.] tandis que la moretenone et le lanostérol sont des composés plus connus comme constituants des plantes supérieures. Il est aussi important de relever que la friedeline, l'acide ursolique et des dérivés du lanostérol ont été identifiés dans les feuilles de différentes espèces du genre *Quercus* [40] [41] , (communément appelé chêne), lequel est justement l'hôte d'*Evernia prunastri* (L.) Ach.

Comme dernier point de cette discussion, nous pouvons mentionner les synthèses. La chimie des produits aromatiques polysubstitués est fort compliquée. Vu les différentes réactivités des substituants et les orientations compétitives des substituants déjà présents sur les noyaux, l'introduction d'un nouveau reste conduit souvent à des mélanges d'isomères qui doivent être séparés par les techniques chromatographiques habituelles.

Les rendements sont généralement assez faibles et les produits obtenus ont souvent plus l'aspect et la consistance d'huile difficile à cristalliser. De nombreux essais ont dû être effectués avant d'arriver aux depsides recherchés.

En définitive, nous croyons cependant avoir pu compléter utilement un travail d'isolement et d'identification par une certaine chimie de synthèse.

10. Partie expérimentale

A) Techniques chromatographiques

10.1. Chromatographie sur couches minces

Le silicagel nous a permis les meilleures séparations pour les substances lichéniques et a été également très utile en synthèse lors des contrôles effectués en cours et après les réactions.

Type_de_silicagel_utilisé: Kieselgel 60 F₂₅₄, plaques Merck sur support aluminium d'épaisseur 0,2 mm.

Solvant: - Pour les phénols et les depsides avec une fonction ester: Ligroïne-AcOEt 9:1, 8:2.

- Pour les phénols et les depsides avec une fonction acide: Toluène-AcOH 20:4, 96:4
Toluène-Dioxane-AcOH 78:20:2.

L'alumine (Al₂O₃) a été utilisée pour la séparation des tri-terpènes et de quelques depsides. Nous avons aussi utilisé des plaques d'oxyde d'alumine 60 F₂₅₄ (type Z), (Merck), épaisseur 0,2 mm.

Solvant: Ligroïne-AcOEt 8:2
Toluène-AcOH 96:1

Les plaques finies de cellulose F₅₀ (Merck), épaisseur de la couche 0,10 mm, nous ont été aussi utiles pour des contrôles en synthèse.

Solvant: AcOH: 2%, 10% et 15%.

10.2. Chromatographie sur couche épaisse

Nous avons eu recours à la séparation sur couche épaisse lorsque les quantités étaient très faibles. Pour cela, nous avons utilisé les plaques finies de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck), 20x20 cm, épaisseur de la couche 2 mm.

Les systèmes de solvant étaient les mêmes que ceux utilisés en CCM analytique.

10.3. Chromatographie sur colonne

Nous avons utilisé des colonnes en verre de diamètre intérieur variant entre 2,5 et 6 cm et de hauteur utile 30 - 130 cm. Munies d'un dispositif permettant un écoulement variable à pression constante. Elles sont remplies avec le support en suspension dans le solvant d'élution.

Elles sont ensuite tassées et lavées par l'éluant choisi. Le mélange à séparer est alors introduit en solution dans l'éluant. Les quantités à introduire sont fonctions du support et de la séparation. La vitesse d'écoulement varie entre 8 ml/h et 40 ml/h pour les grandes colonnes.

Les supports utilisés ainsi que les solvants sont:

- Kieselguhr standard super-cel, Macherey-Nagel

Solvant: Ligroïne-AcOEt 9:1 - 9:9

MeOH

- Polyamide SC-6, Macherey-Nagel (grosseur des grains 0,16)

Solvant: MeOH - H₂O 5:5 - 9:1

- Gel de silice 60 Merck (0,063 - 0,200 mm)

Solvant: Ligroïne-AcOEt 8:2 - 5:5

Toluène

Toluène-AcOH 20:4 - 96:4

- Oxyde d'alumine 90 (activité II-III) Merck

Solvant: Ligroïne-AcOEt 8:2

- Sephadex LH20, Pharmacia

Solvant: MeOH

Tous les solvants ont été distillés.

10.4. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse a été effectuée sur des colonnes de verre (l=2m et 4m, Ø interne: 2mm) remplies soit de silicone SE30 sur chromosorb WAW-DMCS 80-100 mesh (10%), soit de Carbowax 20M sur chromosorb G AW-DMCS 80-100 mesh (5%) et sur colonne SCOT de Carbowax 20m (l=15m, Ø interne=0,5 mm).

Les chromatogrammes ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer modèle 900, muni d'un détecteur à ionisation de flamme avec comme gaz porteur l'Helium (CG-SM) ou l'azote.

Le tableau suivant résume les conditions expérimentales employées lors des séparations des différentes fractions, effectuées au chapitre 6.

Tableau: Conditions expérimentales pour les différents chromatogrammes

chromatogrammes	1 (fig.)	2 (fig.)	3 (fig.)
colonne (L=m)	carbowax 20M, 2m	silicone Se30, 4m	Scot Carbowax 20M, 15m
T ^e injection (°C)	250	250	230
T ^e manifold (°C)	250	250	230
Débit (ml/mm)	20	20	2,5
T ^e colonne (°C)	30-230	175-190	60-230
programmation (°C/mn)	2	2	4

10.5. Chromatographie liquide-liquide sous haute pression (HPLC)

La technique HPLC nous a permis de contrôler la pureté de nos produits. En effet, très souvent un spot sur CCM peut se retrouver divisé en trois composés en HPLC. Comme technique de séparation semi-préparative, la HPLC a complété utilement la CCM préparative. Cependant, la HPLC ne donne pas, contrairement à la CCM, un chromatogramme complet d'un extrait brut de plantes, ou d'une fraction. D'autre part, nous avons été limité quant aux solvants utilisés, à cause de l'absorption dans l'ultra-violet de nos produits.

Les colonnes utilisées sont d'une part une colonne analytique Nucléosil R 50-7 (Macherey-Nagel), Ø interne: 4 mm, l=25 cm, d'autre part une colonne semi-préparative Lichrosorb Si60 7 µm, Ø interne: 8 mm (Knauer).

Solvant: Toluène-AcOH 96:4

Toluène-dioxane-AcOH 100:10:1

Longueur d'onde: 285 nm

B) Techniques analytiques

10.6. Spectroscopie UV

Les spectres UV ont été enregistré sur un appareil Unicam SP 800, en solution dans le méthanol. La concentration des solutions est ajustée de façon à obtenir une absorbance maximale.

10.7. Spectroscopie IR

Les spectres IR sont enregistrés à l'état solide (KBr) 0,4%, sur un appareil Perkin-Elmer modèle 521.

10.8. Résonance magnétique nucléaire du proton

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur trois appareils différents: Varian A60 (60 MHz), Perkin-Elmer R24B (60 MHz) et Bruker WP (200 MHz). Un spectre a été effectué par la maison Spectrospin sur un Bruker WH (360 MHz).

10.9. Résonance magnétique nucléaire du ^{13}C

Un certain nombre de spectres ont été enregistré par la maison Spectrospin (ZH) sur un Bruker HX 90 (20,1MHz), et par Givaudan SA sur un Varian XL-100. Les spectres enregistrés par nous-même sur WP 200 sont à 80,3 MHz.

10.10. Spectrographie de masse et couplage CG-SM

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un appareil Hitachi-Perkin-Elmer RMU-6L dans les conditions suivantes:

- Potentiel d'ionisation: 75 eV.
- Courant d'émission ionique: 50×10^{-6} A.
- Pression: $1,2 \times 10^{-6}$ torr.
- Voltage du photomultiplicateur: 3-5 kv.
- Courant du filament: 3,2 A.
- Courant de la cible: 30×10^{-6} A.
- Temp. source: 100 - 280 °C.
- Echelle de masse: 500 (4,2 VA).
- Vitesse papier: 20 et 100 mm/sec.
- Sensibilité: 3 - 5.

Le système CG/SM comprend un chromatogramme en phase gazeuse Perkin-Elmer, modèle 990 et le spectrographe de masse muni d'un séparateur de Biemann-Watson.

10.11. Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Appareil Siemens S111 avec un détecteur UV Perkin-Elmer LC55.

10.12. Révélateur pour la CCM

Vanilline et acide sulfurique

3 g de vanilline sont dissous dans 100 ml d'alcool éthylique absolu. On ajoute à cette solution 0,5 ml H_2SO_4 (1,84). Une fois le chromatogramme imprégné du réactif, le maintenir à l'étuve à 120°C pendant 5 minutes.

10.13. Hydrolyse basique

5 mg de substance en solution dans 10 ml de KOH méthanolique 5% sont chauffés à reflux 2 à 4 heures. Après refroidissement, la solution est régénérée par H_2SO_4 2N et extraite à l'éther. L'extrait est concentré et analysé par CCM ou le dérivé triméthyl-silylé est effectué et l'analyse est faite par CG/SM. (Réactif: 1 ml de bis-triméthylsilyl)-N,O-trifluoracétamide).

10.14. Acétylation

L'acétylation est effectuée à température ambiante. 10 mg de substance, 15 ml d'anhydride acétique fraîchement distillé et 3 ml de pyridine anhydre sont réunis et agités jusqu'à dissolution complète. On ajoute une pointe de spatule d'acétate de sodium anhydre. Le mélange réactionnel est ensuite abandonné pendant 24 heures.

Cette solution est enfin concentrée et l'huile restant est traitée avec de la glace pilée afin de faire précipiter le dérivé acétylé. Celui-ci est recueilli par filtration et recristallisé dans l'hexane-AcOEt.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Stenhouse, Liebigs Ann. Chem. 68, 83, (1848).
- [2] Hesse, Liebigs Ann. Chem. 117, 312, (1861).
- [3] Pfau, Ber. Deutsch. chem. Ges. 57, 468, (1924).
- [4] A. St. Pfau, Helv. 9, 650, (1926).
- [5] A. St. Pfau, Helv. 11, 864, (1928).
- [6] A. St. Pfau, Helv. 17, 1319, (1934).
- [7] Wahlbaum, Ber. Deutsch. chem. Ges. 57, 770, (1924).
- [8] Spath, Ber. Deutsch. chem. Ges. 57, 471, (1924).
- [9] M. Stoll et W. Scherrer, 17ème Congrès de Chimie Industrielle, Paris, 205-12, (1937).
- [10] B. Corbier et P. Teisseire, Recherches 19, 291-94 , (1974).
- [11] R. Ter Heide, N. Provatoroff, P.C. Traas, P.J. de Valois, H.J. Wobben, R. Trimmer, J. Agric. Food Chemistry 23, 950 (1975).
- [12] J. Gavin et R. Tabacchi, Helv. 58, 190, (1975).
- [13] J. Schultz et K. Mosbach, J. Biochem. 22, 153-157, (1971).
- [14] C.F. Culberson, Chemical and Botanical Guide to Lichen Products, Carolina Press (1969).
- [15] K. Mosbach, Angew. Chem. 8, 4, (1969).
- [16] C.F. Culberson, W.L. Culberson et A. Johnson, Second Supplement to "Chemical and Botanical Guide to Lichen Products", St. Louis, (1977).
- [17] Thèse Gavin
- [18] F.H. Curd and A. Robertson, J. Chem. Soc. 1173-9, (1933).
- [19] S. Huneck, C. Djerassi, D. Becher et M. Barber, M. von Ardenne, K. Steinfelder et R. Tümmeler, Tetrahedron 24, 2707, (1968).
- [20] H. Budzikiewicz, J.M. Wilson et C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3688, (1963).
- [21] M.N. Galbraith, C.J. Miller, J.W.L. Rawson, E. Ritchie, J.S. Schannon et W.C. Taylor, Austral. J. Chemistry 18, 226, (1965).

- [22] G.C. Levy et G. Nelson, Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists, Wiley, Interscience, 1972.
- [23] Y. Asahina et S. Shibata, Chemistry of Lichen Substances, Vaals. Amsterdam, 1971.
- [24] F. Hemmert, B. Lacoume, J. Levisalles et G.R. Pettit, Bull. Soc. chim. France 161, 976, (1966).
- [25] M. Shamma, R.E. Glick et R.O. Mumma, J. Org. Chemistry 27, 4512, (1962).
- [26] Kier, L.B., J. pharm. Soc. 50, 471, (1961); 52, 465, (1963).
- [27] J. Carbonier et D. Molho, Travaux Lab. de la Jaysinia 4, p. 192, (1973).
- [28] E. Wenkert and P. Beak, J. Amer. Chem. Soc. 83, 998, (1961).
- [29] Eight Peak of Mass Spectra, Mass Spectrometry Data Centre, 2nd Ed., (1974).
- [30] C. Culberson, Microchemistry J. 7, 153, (1963).
- [31] C. Culberson, Phytochemistry 2, 335, (1963).
- [32] J.L. Ramant, Phytochemistry 4, 199, (1965).
- [33] J.L. Ramant et M. Courvisier, Bull. Soc. Royale des Sciences de Liège 5-8, 385, (1971).
- [34] G.M. Gaucher, M.G. Shepherd, Biochemical Preparations, Vol. 13, Wiley, New York, (1971).
- [35] E. Fischer et K. Freudenberg, Berg. Deutsch. chem. Ges. 46, 1133, (1913).
- [36] S.K. Manaktala, S. Neelakanten et T.R. Seshadri, Indian J. Chem. 3, 520-22, (1965).
- [37] C.J. Brown, D.E. Clarke, W.D. Ollis et P.L. Veal, Proc. chem. Soc. 393, (1960).
- [38] J.A. Elix, Austr. J. Chemistry 27, 1767-79, (1974).
- [39] T. Bruun, Acta chem. Scand. 23, 3038-3042, (1969).
- [40] W.H. Hui and M.M. Li, J. chem. Soc. Perkin I, 897-904, (1977).
- [41] W.H. Hui and C.T. HO, Austr. J. Chemistry 21, 1675-7, (1968).

